

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**Ivan Vičić**

**Patogeneza koštanih metastaza solidnih  
tumora**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2018.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**Ivan Vičić**

**Patogeneza koštanih metastaza solidnih  
tumora**

**DIPLOMSKI RAD**

**Zagreb, 2018.**

Ovaj diplomski rad izrađen je na Katedri za patofiziologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom doc.dr.sc. Borislava Beleva i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2017./2018.

## Kratice

AKT = PKB (engl. *protein kinase B*) – protein kinaza B

atRA (engl. *all-trans retinoic acid*) – trans retinoična kiselina

BMP (engl. *bone morphogenic protein*) – koštani morfogogenetski protein

cAMP (engl. *cyclic ATP*) – ciklički ATP

CAR (engl. *CXCL12-abundant reticular cells*) – CXCL12 bogate retikularne stanice

CDK4 (engl. *cyclin-dependent kinase 4*) – o ciklinu ovisna kinaza

CTGF (engl. *connective tissue growth factor*) – čimbenik rasta vezivnog tkiva

DKK1 (engl. *Dickkopf-related protein 1*) – protein srodan Dickkopfu 1

DMP1 (engl. *dentin matrix acidic phosphoprotein 1*) – dentinski matriksni kiseli fosfoprotein  
1

EGFR (engl. *epidermal growth factor receptor*) – receptor za epidermalni čimbenik rasta

ERK (engl. *extracellular signal-regulated kinases*) – izvanstaničnim signalima regulirana  
kinaza

GAS6 (engl. *growth arrest-specific 6*) – specifični protein 6 za regulaciju rasta stanica

Gfi (engl. *growth factor independent*) – o čimbeniku rasta neovisan protein

HGFR (engl. *hepatocyte growth factor receptor*) – receptor za hepatocitni čimbenik rasta

IGF-IR (engl. *insulin-like growth factor receptor*) – receptor za inzulinu sličan čimbenik rasta

JNK (engl. *c-Jun N-terminal Kinase*) – c-Jun N-terminalna kinaza

MAPK (engl. *mitogen-activated protein kinase*) – mitogenom aktivirana proteinska kinaza

MIP (engl. *macrophage inflammatory protein*) – makrofagni upalni protein

Mitf (engl. *melanogenesis associated transcription factor*) – s melanogenezom povezan transkripcijski čimbenik

MMP (engl. *matrix metalloproteinaze*) – matriksna metaloproteinaza

NFAT (engl. *nuclear factor of activated T-cells*) – jezgrin čimbenik aktiviranih T stanica

NFκB (engl. *nuclear factor κ-B*) – jezgreni čimbenik κ-B

NR2F1 (engl. *nuclear receptor subfamily 2 group F member 1*) – jezgrini čimbenik 1  
podobitelj 2 grupa F

PSA (engl. *prostate specific antigene*) – prostatični specifični antigen

PTHrP (engl. *parathyroid hormone-related protein*) – protein srodan paratiroidnom hormonu

RANKL (engl. *receptor activator of nuclear factor κ-B ligand*) – ligand za receptor aktivator nuklearnog čimbenika κ-B

RAR (engl. *retinoic acid receptor*) – receptor za retinoičnu kiselinu

RUNX2 (engl. *runt-related transcription factor 2*) – runt srodan transkripcijski čimbenik 2

SDF-1 (engl. *stromal-derived factor 1*) – čimbenik deriviran iz stromalnih stanica 1

SIBLING (engl. *small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins*) – mali integrin vežući ligand N-vezani glikoprotein

siRNA (engl. *small interfering RNA*) – male interferirajuće RNA

SLRP (engl. *small leucine-rich proteoglycans*) – mali proteoglikani bogati leucinom

TNF (engl. *tumor necrosis factor*) – čimbenik tumorske nekroze

TRAF (engl. *TNF receptor-associated factor 1*) – čimbenik združen s TNF trcrptorom 1

TRAP (engl. *tryptophan regulated attenuation protein*) – triptofanom regulirani atenuirajući protein

uPA (engl. *urokinase-type plasminogen activator*) – urokinazni aktivator plazminogena

VCAM-1 (engl. *vascular cell adhesion protein*) – vaskularna adhezijska molekula 1

VEGFR (engl. *vascular endothelial growth factor receptor*) – receptor za vaskularni endotelni čimbenik rasta

ZO-1 (lat. *zona occludens 1*) – čvrstospojni protein 1

# Sadržaj

Sažetak

Summary

<b>1. Uvod.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Koštani tropizam tumorskih stanica .....</b>	<b>3</b>
2. 1. Utkivljenje tumorskih stanica.....	3
2.1.1. Prijelaz kroz stijenku krvne žile .....	3
2.1.2. Prijelaz u koštane prostore .....	4
2.2. Adhezija tumorskih stanica .....	6
2.3. Uloga matricelularnih proteina.....	8
<b>3. Osteolitične metastaze.....</b>	<b>11</b>
3.1. Stimulacija funkcije osteoklasta.....	11
3.2. Inhibicija funkcije osteoblasta.....	14
3.3. Mehanizam pozitivne povratne sprege u progresiji osteolitičnih metastaza.....	16
<b>4. Osteoblastične metastaze .....</b>	<b>18</b>
4.1. Prevaga osteoblastičnih procesa.....	18
4.2. Mehanizam pozitivne povratne sprege u progresiji osteoblastičnih metastaza.....	20
<b>5. Rani razvoj koštanih metastaza .....</b>	<b>22</b>
5.1. Mehanizmi „uspavanosti“ tumorskih stanica.....	24
5.2. Uloga miRNA u koštanim metastazama .....	27

5.3. Utjecaj imunosnih stanica .....	29
<b>6. Klinički primjenjene spoznaje .....</b>	<b>31</b>
6.1. Registrirane terapijske opcije .....	31
6.2. Terapijske opcije u razvoju .....	33
<b>7. Zaključak .....</b>	<b>34</b>
<b>8. Literatura .....</b>	<b>35</b>
<b>9. Životopis .....</b>	<b>55</b>
<b>10. Zahvale .....</b>	<b>56</b>



## **Sažetak**

### **Patogeneza koštanih metastaza solidnih tumora**

**Ivan Vičić**

Kosti su učestalo mjesto tumorskih metastaza te su češće od primarnih koštanih tumora. Visoka učestalost i velika klinička značajnost postavljaju koštane metastaze visoko na listi prioriteta liječenja tumorskih bolesti. Iako tumorske metastaze mogu zahvatiti bilo koju kost, gotovo isključivo zahvaćaju područja crvene koštane srži. Koncept metastaziranja u kosti jest poremećaj fiziološke koštane pregradnje iskorištavajući iste molekularne mehanizme koje koriste lokalne koštane stanice u regulaciji koštanih metaboličkih procesa. Koštane metastaze mogu se opisati kao osteolitične, osteoblastične i mješovite, iako takve kategorije predstavljaju samo ekstreme kontinuuma poremećaja koštane pregradnje. U osteolitičnim koštanim metastazama, karakterističnim za tumore dojke, diferencijacija i aktivnost osteoklasta je pospješena prvenstveno RANKL/RANK sustavom, i to indirektno, ali i direktno posredovano drugim čimbenicima. Istovremeno je aktivnost osteoblasta inhibirana. Tumorske stanice iskorištavaju čimbenike oslobođene koštanom resorpcijom, uspostavljajući sustav pozitivne povratne sprege koja dalje pospješuje metastatski proces. U osteoblastičnim metastazama, karakterističnih za tumore prostate, čimbenici lučeni iz tumorskih stanica direktno pospješuju diferencijaciju i aktivnost osteoblasta. Osteoklastična aktivnost je također pospješena, doduše u manjoj mjeri, a sustav pozitivne povratne sprege je uspostavljen nešto drugačijim mehanizmom. Tropizam tumorskih stanica je zasebno opisan, a opisani su i mehanizmi vezani uz „uspavanost“ tumorskih stanica i rani razvoj metastaza. Tumorski učinak na koštani mikrookoliš putem izlučenih čimbenika, membranskih čimbenika i egzosoma, je ključni korak u uspostavi početne koštane lezije koja nakon varijabilnog vremena „uspavanosti“ diseminiranih tumorskih stanica napreduje u izraženo stanje. Mnogi mehanizmi su iskorišteni kao terapijske mogućnosti, ili su u kliničkim studijama, no rezultati su raznoliki.

Ključne riječi: metastaze solidnih tumora, koštani mikrookoliš u metastatskom procesu, osteolitične metastaze, osteoblastične metastaze, circulus vitiosus u koštanim metastazama.

## **Summary**

### **Pathogenesis of bone metastasis in solid tumors**

**Ivan Vičić**

The bone is a frequent site of tumor metastasis which is more frequently seen than primary bone tumors. High occurrence and significant clinical features impose bone metastasis as a prominent issue in the treatment of a wide variety of tumor diseases. Bone metastasis can involve any bone, but areas of red bone marrow are almost exclusively affected. The basis of metastasizing to the bone is the disruption of the physiological remodeling process by employing the same molecular mechanisms native bone cells use in the lifelong bone turnover. These bone lesions can be characterized as osteolytic, osteoblastic, and mixed, although this classification only represents extremes of a continuum of the bone remodeling dysregulation. In osteolytic bone metastasis, as seen most often in breast cancer, differentiation and function of osteoclasts is promoted via the RANKL/RANK signal pathway indirectly, and other factors independently of that pathway, directly. At the same time osteoblast function is diminished. Tumor cells also take advantage of factors released by bone tissue resorption, thus establishing a vicious cycle that promotes the metastatic process. In osteoblastic metastasis, as seen most often in prostate cancer, the differentiation and function of osteoblasts is promoted by factors secreted from tumor cells directly. Osteoclast activity is also promoted, although to a lesser extent. A positive feedback loop is established by a somewhat different mechanism. Bone osteotropism is separately approached, and mechanisms involved in early stages of bone metastasis and cancer cell dormancy are described. Tumor effect on the bone marrow microenvironment via exosomes, soluble factors, and membrane-bound ligands is of the utmost importance in the establishment of an initial lesion, which, after a variable duration of disseminated tumor cells dormancy, progresses to an overt condition. Many of the described mechanisms are involved in a variety of trials, with a plethora of different results.

**Keywords:** solid tumor metastases, bone microenvironment in metastatic process, osteolytic metastases, osteoblastic metastases, vicious cycle in bone metastases

# 1. Uvod

U današnje doba, tumorske bolesti opterećuju čovječanstvo u sve većoj mjeri. Proces metastaziranja čini granicu između bolesti lokalizirane na mjestu početne zloćudne preobrazbe i bolesti praktički neograničenog potencijala širenja, što često donosi propast nade za izlječenje i navještava skori svršetak života. Koštane metastaze treće su po učestalosti, iza pluća i jetre (1), a s obzirom na učestale kliničke manifestacije i visoki stupanj onesposobljenosti uzrokovan istim, čine ozbiljan problem u tijeku tumorskih bolesti. Iako o učestalosti koštanih metastaza u tumorskim bolestima nije lako govoriti u smislu apsolutnih brojeva s obzirom na razlikovanje po stadijima bolesti, procjenjena je učestalost u uznapredovalom, metastatskom stadiju pojedinih primarnih tumora (Tablica 1).

Tablica 1. Procjenjena učestalost koštanih metastaza u metastatskom stadiju bolesti

Mjesto primarnog tumora	Učestalost koštanih metastaza	
multipli mijelom	70-95%	(1)
karcinom prostate	65-90%	(2)
karcinom dojke	65-75%	(3)
karcinom štitnjače	65%	(1)
karcinom pluća	17-64%	(1)
melanom	14-45%	(1)
karcinom mokraćnog mjehura	40%	(1)
karcinom bubrega	20-25%	(1)
kolorektalni karcinom	10%	(4)

Osim visoke učestalosti u čestim tumorskim bolestima, i značajne onesposobljenosti, važna je i prediktivna uloga pojave koštanih metastaza. Naime, medijan preživljenja od dijagnoze koštanih metastaza za sljedeće tumore jest: za karcinom prostate 12-53 mjeseci, za karcinom dojke 19-25 mjeseci, za karcinom štitnjače 48 mjeseci, za karcinom pluća 6-7 mjeseci, za melanom 6 mjeseci, za karcinom mokraćnog mjehura 6-9 mjeseci, za karcinom bubrega 12 mjeseci (5).

Koštane metastaze opisuju se kao osteolitične i osteoblastične, osteolitične se tipično susreću u karcinoma dojke, a osteoblastične u karcinoma prostate (6). Svi poznati mehanizmi koji opisuju proces metastaziranja u kost uključuju poremećaje fiziološke pregradnje kosti, odnosno poremećaje ravnoteže djelovanja osteoblasta, osteoklasta te osteocita. Iako je tradicionalna podjela na osteolitične i osteoblastične metastaze još uvijek široko prihvaćena i korištena, postoji zamjerka takvom nazivlju koja se odnosi na činjenicu da se koštane metastaze ne mogu striktno podijeliti na dvije kategorije, već da su spomenute kategorije samo ekstremiti jednog kontinuuma. Dokazana je istovremena aktivnost osteoblasta i osteoklasta bez obzira na ukupni učinak na koštanu masu, te pojava područja prevladavanja smanjenja, odnosno povećanja koštane mase u različitim koštanim metastazama, što potvrđuje postojanje obaju procesa u tim različitim kliničkim entitetima (7).

## 2. Koštani tropizam tumorskih stanica

Od samog početka promatranja tumorskih bolesti kao jedinstvenih, pozornost su privlačili uzroci nastanka metastaza, te čimbenici koji su određivali sklonost pojedinih tumora pojedinim udaljenim metastatskim žarištima. 1889. Stephen Paget predlaže *seed and soil* hipotezu kojom pretpostavlja da su za takav organotropizam tumorskih stanica zaslužni osim karakteristika samih stanica i karakteristike ciljnog organa odnosno tkiva (8). Današnja istraživanja ostvaruju te davne ideje te se koncentriraju i na osobine ciljnog tkiva, odnosno na interakciju tumorskih stanica, stanica udaljenih organa i nestaničnih komponenti tkiva.

Postavlja se pitanje u kojem trenutku tumorske stanice dobivaju te karakteristike koje ih određuju za sklonost prema jednom organu. Intuitivno je, a za neke tumore i dokazano, da je tome uzrok u promjeni genske ekspresije još na mjestu primarnog tumora, na način da se iz raznih klonova raznovrsnih karakteristika ističu one koje su postale najbližnje hematopoetskim matičnim stanicama, čije će im osobine omogućiti djelovanje u koštanom tkivu, no postoji mogućnost i da su takve osobine stečene selekcijom na razini ciljnog organa (9).

### 2. 1. Utkivljenje tumorskih stanica

Proces utkivljenja podrazumijeva prijelaz tumorskih stanica iz krvotoka u prostor koštane srži u kojem one zahvaljujući svojim stečenim karakteristikama opstaju te međudjelovanjem sa staničnim i nestaničnim elementima tkiva narušavaju strukturu i funkciju kosti.

#### 2.1.1. Prijelaz kroz stijenku krvne žile

Specifična struktura krvnih žila u koštnoj srži, a koja uključuje sinusoidalne krvne žile pogoduje lakšoj ekstrasvazaciji tumorskih stanica kroz krvne žile. Te sinusoidalne krvne žile su fenestrirane te im uvelike nedostaje potporna struktura uobičajenog kapilarnog bazena koja,

između ostalog, utječe na prolaz tvari i stanica iz lumena, te je na taj način fizikalnim karakteristikama povećana vjerojatnost prolaska tumorskih stanica (10, 11). Osim same strukture krvnih žila, koja pasivno omogućuje prolaz tumorskih stanica, ulogu u metastaziranju ima i lokalna razlika u količini krvnih žila, što podrazumjeva uspjelije stvaranje nakupina tumorskih stanica u jače prokrvljenim djelovima koštane srži (12). U procesu ekstravazacije sudjeluju i brojne adhezijske molekule čija će uloga biti napomenuta pri njihovom spominjanju u tekstu.

## 2.1.2. Prijelaz u koštane prostore

### 2.1.2.1. Uloga kemokina i kemokinskih receptora

Kemokini su proteini svrstani u jednu superobitelj sa nešto više od 50 članova. Razvrstani su u četiri skupine (CXC, CX3C, CC, C), s obzirom na poziciju cisteinskog ostatka. Receptori su članovi skupine G protein-spregnutih transmembranskih proteina (13).

CXCL12 (poznat i kao SDF-1 (*stromal-derived factor 1*)) pripada skupini CXC kemokina, identificiran je kao čimbenik rasta pre-B limfocita, te kao moćni kemotaksijski čimbenik za razne stadije hematopoetskih stanica. Od sedam do sada poznatih izoformi tog kemokina, CXCL12- $\alpha$  jest najzastupljeniji u ljudskom organizmu te u koštanoj srži gdje ga stvaraju ponajviše osteoblasti (14, 15). Njegovi učinci posredovani su receptorima CXCR4 i CXCR7. Djelovanje putem receptora CXCR4 dobro su istraženi i uključuju djelovanje G $\alpha$ i te posljedično smanjenje razine cAMP-a, promjenu unutarstanične razine kalcija i aktivaciju ERK 1/2, MAPK, JNK, AKT signalnih puteva. Djelovanje uključuje promjenu odnosa citoskelenih elemenata u smislu polimerizacije i polarizacije aktina, formiranja pseudopodija i pospješena adhezije na epitelne stanice i elemente izvanstaničnog matriksa (15, 16, 17). Pretpostavlja se da CXCR7 receptori djeluju kao koreceptori u heterodimernoj konstelaciji s receptorom CXCR4, te na taj način također posreduju djelovanju CXCL12 kemokina (18). Osim koreceptorskog

djelovanja, dokazana je aktivacija MAPK putem  $\beta$ -arestina, dakle djelovanje koje nije posredovano G proteinima (19). CXCL12/CXCR4 interakcija čini se da je uključena u smještaju brojnih tumorskih stanica u koštane prostore mehanizmom kemotaksije tumorskih stanica koje izražavaju CXCR4. Jedno istraživanje pokazalo je viši izražaj CXCL12 u tkivima koja su učestala mjesta metastaza tumora prostate (kost, jetra, bubreg), u usporedbi s drugim lokalizacijama, a također, pokazan je izražaj CXCR4 i CXCR7 receptora na tumorskim stanicama (20, 21), te je blokiranjem prijenosa signala putem CXCR4 umanjen potencijal za stvaranje koštanih metastaza tumora prostate (22). Slični rezultati pokazani su i za tumore dojke (23), sitnostanične tumore pluća (24), tumore gušterače (25). Za tumore prostate pokazano je i da se tijekom starenja povećava izražaj CXCL12 u koštanoj srži što određuje mjesto metastaza u starijoj dobi učestalih tumora prostate (26). Uloga ovog sustava pokazana je i u neoplazijama koje primarno zahvaćaju kost kao što su akutna mijeloična leukemija, multipli mijelom, B stanična limfocitna leukemija, gdje se tom sustvu pridaju uloge čimbenika rasta i preživljena tumorskih stanica (27). Osim CXCL12/CXCL4 para, kemotaktična svojstva pokazuje i djelovanje CXCL16 te njegov receptor CXCR6, na način analogan prethodno opisanom kemokinu (28).

#### 2.1.2.2. Djelovanje aneksina II i njegovog receptora

Aneksin II je protein mase 36 kDa, prisutan u procesima unutar stanice, kao membranski protein te komponenta vanstaničnog matriksa. Postoji u monomernom, heterodimernom i heterotetramernom obliku (29). Na ekspresiju utječu inzulin, čimbenik rasta fibroblasta te epidermalni čimbenik rasta (30). Nalazi se izražen na endotelnim stanicama, gdje igra ulogu u aktivaciji plazminogena usidravajući komponente fibrinolitičkog sustava (31). Dokazana je i njegova ekspresija na osteoblastima gdje sudjeluje u smještaju i regulaciji preživljavanja krvotvornih matičnih stanica unutar prostora nazvanih niše matičnih stanica (29). Nalazi se također i na brojnim tumorskim stanicama kao što su stanice hepatocelularnog karcinoma,

karcinoma želuca, adenokarcinoma gušterače, akutne promijelocitne leukemije te glioma u kojima ima ulogu u modifikaciji fibrinolitičke aktivnosti, adheziji i invaziji diseminiranih tumorskih stanica (32). Interakcija aneksina II i njegovog receptora pridonosi tropizmu tumorskih stanica na sličan način kako regulira smještaj krvotvornih matičnih stanica.

Dokazana je prisutnost receptora za aneksin II na stanicama tumora prostate, te važnost interakcije tih receptora s aneksinom II na osteoblastima u formiranju koštanih metastaza. U prisutnosti CXCL12 u ulozi kemotaksijskog čimbenika uočena je uloga aneksina II u migraciji stanica tumora prostate u koštane prostore, budući da je onemogućavanje izražaja receptora za aneksin II, koristeći se siRNA koja onemogućuje sintezu receptora za aneksin II, postignut manji broj metastaza u *in vivo* modelima bolesti (29).

## 2.2. Adhezija tumorskih stanica

Za opstanak metastatskih tumorskih stanica neobično je važna sposobnost adhezije, bilo za susjedne stanice, bilo za nestanične elemente tkiva. Ta sposobnost osim mehaničkog povezivanja stanica u novoj sredini sudjeluje i u međudjelovanju između tumorskih stanica i stanica nove sredine djelujući na procese u tumorskim stanicama (16).

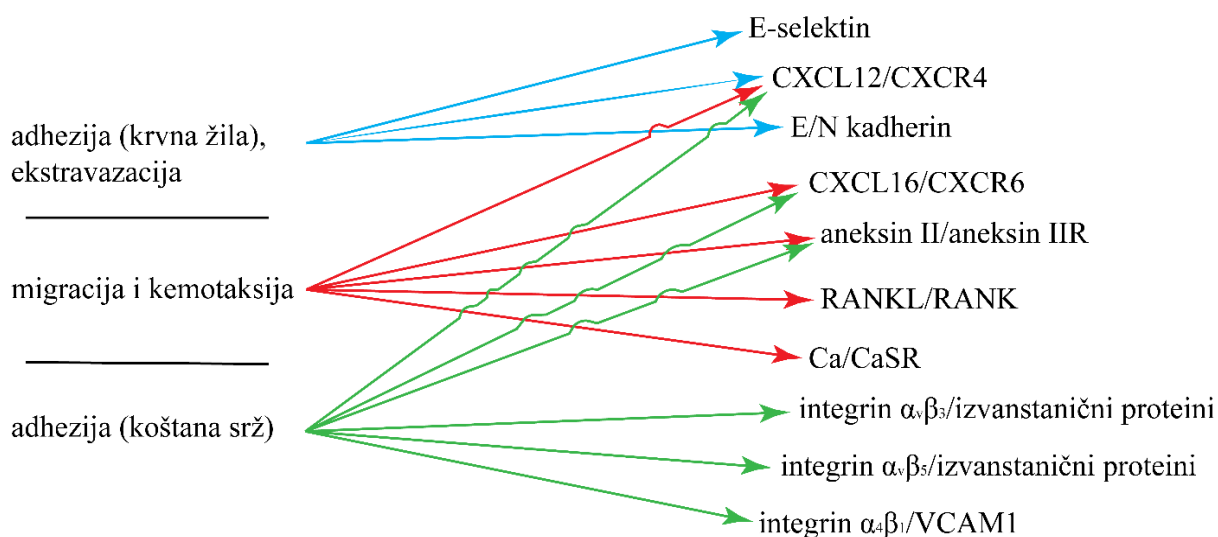
Važnu ulogu u adheziji tumorskih stanica imaju pričvrtni spojevi posredovani interakcijom E- i N-kadherina u heterotipnim pričvrtnim spojevima (33). U patogenezi epitelno-mezenhimske tranzicije velika važnost pridana je upravo gubitku spojeva između tumorskih stanica primarnog tumora, posredovanom smanjenim izražajem E-kadherina. No također je pokazana i važnost E-kadherina u pričvrtnim spojevima između tumorskih stanica i stanica koštanog tkiva. Pokazan je izražaj N-kadherina i OB-kadherina na mezenhimalnim matičnim stanicama u koštanoj srži te N-kadherina na endotelnim stanicama (34). Pronađeno je da stanice tumora dojke koje izražavaju E-kadherin imaju veću sposobnost stvaranja koštanih metastaza i slabije preživljenje (35). Taj pričvrtni spoj građen od E- i N-kadherina jest karakterističan za



koštane metastaze, a dokazan je pojačanom ekspresijom  $\alpha$ -katenina,  $\beta$ -katenina i p120-katenina koji su sastavnice pričvrstnih spojeva, te nije identificiran u metastazama ostalih lokacija (34).

Još je jedna skupina membranskih proteina važna u adhezivnim svojstvima tumorskih stanica u koštanim prostorima, a to su integrini. Integrini su membranski proteini koji posreduju u mehaničkim i signalnim interakcijama stanica sa izvanstaničnim matriksom. Građeni su od dvije transmembranske jedinice  $\alpha$  i  $\beta$ . U sisavaca je pronađeno 18  $\alpha$  i 8  $\beta$  podjedinica koje zajedno tvore 24 cjelovita integrinska proteina, koji se vežu za vlastite, ne nužno jedinstvene, ligande izvanstaničnog matriksa. Osim adhezivnih svojstava, utječu i na polarizaciju stanica, organizaciju citoskeleta te mogu aktivirati unutarstanične signalne puteve (36). Jedan od integrina tip  $\alpha_2\beta_1$  koji veže kolagen tip I dokazan je na stanicama tumora prostate koje čine koštane metastaze, za razliku od stanica tumora prostate koje čine visceralne metastaze. Također neutralizacija integrina  $\alpha_2\beta_1$  protutijelom specifičnim za taj protein oslabljuje adheziju tumorskih stanica u kosti (37). Za tumore dojke dokazana je i uloga  $\alpha_v\beta_3$  i  $\alpha_v\beta_5$  integrina u adheziji za koštani sijaloprotein, vitronektin i osteopontin, koji su proteini izvanstaničnog matriksa (38). Integrin  $\alpha_v\beta_3$  dokazan je i u tumorima prostate. Na životinjskim modelima pokazan je učinak neproteinskih inhibitora integrina  $\alpha_v\beta_3$  koji su uspješno smanjivali stvaranje koštanih metastaza laboratorijskih tumorskih staničnih linija (39, 40). Iako multipli mijelom nije primjer koštane metastatske bolesti, već primarnog mjesta tumora, čini se da su interakcije između tumorskih i netumorskih elemenata vrlo slični interakcijama u koštanim metastazama. Tako je u multiplom mijelomu dokazana veza između integrina  $\alpha_4\beta_1$  koji se nalazi na mijelomskim stanicama te VCAM-1 molekula na ST2 stromalnim stanicama koštane srži. U ovom je primjeru osim adhezijske uloge dokazana i pojačana osteoklastogeneza neovisna o tipičnom načinu pokretanja putem tumorskih citokina, što upućuje, osim na mehaničku adhezijsku funkciju, i na ulogu integrina u međustaničnoj komunikaciji (41).

Osim nabrojanih i opisanih adhezijskih molekula u adheziji tumorskih stanica u koštanim metastazama, uočena je i uloga već opisanih membranskih proteina CXCL12/CXCL4, te aneksina II i njegovog receptora. Oni pospješuju osim već opisanu kemotaksiju i migraciju tumorskih stanica također i mehaničku povezanost između tumorskih stanica i stanica koštane srži, a mehanizmom koji je neovisan o već opisanim mehanizmima budući da se oba nalaze izražena na membranama osteoblasta i stromalnih stanica te tamo djeluju kao adhezijske molekule (23, 29).



Slika 1. Zbirno prikazano međudjelovanje tumorskih i netumorskih stanica

## 2.3. Uloga matricelularnih proteina

U izvanstaničnom matriksu osim proteina koji obavljaju prvenstveno strukturnu i potpornu ulogu kao što su kolagen tip I ili fibronektin, postoje i proteini čija je uloga posredovanje između staničnih i nestaničnih te nestaničnih i nestaničnih elemenata tkiva, a

nazivaju se matricelularni proteini. Ti proteini ostvaruju svoje modulatorne učinke preko membranskih receptora kao što su integrini, mehaničkom interakcijom sa strukturnim proteinima, te djelujući na čimbenike rasta ili enzime u izvanstaničnom matriksu. Zbog njihove veće zastupljenosti u koštanom tkivu u usporedbi s drugim tkivima, uloga u metastatskim procesima jest to naglašenija (42).

Mali proteoglikani bogati leucinom (engl. *Small leucine-rich proteoglycans, SLRPs*) obitelj su matricelularnih proteina koji imaju ulogu u izgradnji izvanstaničnog matriksa, vezivanju citokina, a u procesima upale, koštanog i neuralnog razvoja. U tu skupinu spada 18 proteina među kojima je dokazana uloga u tumorskim bolestima za dekorin, biglikan, asporin te lumikan (43). Dekorin je najbolje proučen matricelularni protein u patogenezi koštanih metastaza. Djeluje u povezivanju između kolagenih vlakana (44). Utvrđena je manja koncentracija dekorina u stromalnom tkivu karcinoma, a također i u izvanstaničnom matriksu mezenhimalnih matičnih stanica i osteoblasta u metastatskoj bolesti u usporedbi s normalnim koštanim tkivom (43). U mišjim modelima pokazano je da sistemska primjena onkolitičkog adenovirusa koji eksprimira dekorin sprječava koštane metastaze modela karcinoma prostate (45). Mehanizam djelovanja dekorina na tumorske stanice je inhibitorno djelovanje na tirozin-kinazne receptore kao što su receptor za epidermalni čimbenik rasta (EGFR), receptor za tip I inzulinu sličnog čimbenika rasta (IGF-IR) i receptor za čimbenik rasta hepatocita (HGFR ili c-Met)(46, 47).

Sljedeća skupina matricelularnih proteina jesu SIBLINGs (engl. *Small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins*), 5 proteina koji imaju važnu ulogu u funkciji koštanog tkiva, a dokazana je i njihova uloga u različitim stupnjevima procesa metastaziranja (43). Osteopontin je matricelularni protein koji obavlja brojne funkcije, a prvi je puta pronađen kao sastavni dio koštanog matriksa. Stvaraju ga osteoblasti i njihovi prekursori te osteoklasti. Jedna od funkcija je sidrenje osteoklasta za koštani matriksa vezujući se za integrin  $\alpha\text{v}\beta_3$ , te su miševi bez

osteopontina otporni na koštanu resorpciju bilo kojeg uzroka (48, 43). Njegova uloga u procesu metastaziranja čini se od velike važnosti. Različiti polimorfizmi gena za osteopontin koreliraju sa različitim potencijalom stvaranja koštanih metastaza, te induciran izražaj osteopontina u stanicama tumora dojke koje su manjkave za njega rezultira stvaranjem koštanih metastaza (49, 50). U istu skupinu matricelularnih proteina spada i koštani sijaloprotein, protein koji se nalazi u svim vrstama mineraliziranih tkiva, gdje vežući hidroksiapatit služi kao jezgra mineralizacije. U tumorskim bolestima ima prognostičku ulogu mjeren bilo u serumu ili u tumorskom tkivu (43). U modelu tumora dojke stanice u kojima je potaknut izražaj koštanog sijaloproteina, pokazuju povećano stvaranje koštanih metastaza (51). Također *in vivo* smanjenje izražaja koštanog sijaloproteina putem *antisense* nukleotida smanjuje veličinu i incidenciju koštanih metastaza (52). Osim ova dva proteina iz te skupine ulogu u tumorskom metastaziranju ima i matriksni protein dentina 1 (DMP1) s nedovoljno utvrđenim utjecajem (43).

Važnu ulogu u koštanom metabolizmu i procesu metastaziranja imaju i proteini iz obitelji CCN matricelularnih proteina (43). Povećana ekspresija CCN2 (poznat i kao CTGF) proteina utvrđena je u stanicama koštanih metastaza tumora dojke u usporedbi s normalnim epitelnim stanicama dojke, a također je CCN2 izražaj utvrđen kao osobina koštanih metastaza u usporedbi sa drugim metastatskim mjestima (50, 53).

Osim nabrojanih proteina ulogu u stvaranju koštanih metastaza imaju i drugi matricelularni proteini kao što su osteonektin, trombospondini, te tenascini (43). Njihova važnost u smještaju metastatskih stanica u koštano tkivo sve se više povećava, a neke terapijske strategije, poput upotrebe bisfonata (54), povezuju se i s mehanizmima djelovanja matricelularnih proteina.

### 3. Osteolitične metastaze

U fiziološkim uvjetima procesi izgradnje i resorpcije kosti su u precizno reguliranoj dinamičkoj ravnoteži, a te uravnotežene procese nazivamo koštanom pregradnjom. U raznih tumorskih bolesti kao što su karcinom bubrega, nesitnostanični karcinom pluća, maligni melanom, karcinomi štitnjače, ne-Hodgkinov limfom, multipli mijelom te najpoznatiji predstavnik karcinom dojke, postoji prevaga resorptivnih procesa u koštanim metastazama (6). Povećana aktivnost osteoklasta je glavni uzrok resorpcije koštanog tkiva. U uznapredovalim fazama bolesti uzročni čimbenik resorpcije kosti je i kompromitirana vaskularizacija efektom mase tumorskih stanica u koštanim prostorima (1). Osim čimbenika koji pojačavaju aktivnost osteoklasta, tumorske stanice djeluju i smanjujući aktivnost osteoblasta također lučenjem skupine čimbenika, te iskorištavajući mehanizme i tvari koštanog tkiva za vlastiti napredak uprezanjem cijele palete tvari u mehanizam pozitivne povratne sprege (7).

#### 3.1. Stimulacija funkcije osteoklasta

U procesima koštane pregradnje jedan od sustava koji osiguravaju komunikaciju između osteoblasta i osteoklasta jest sustav membranskih receptora ephrinB2 i EphB4. EphB4 nalazi se u koštanom tkivu na osteoblastima i na stromalnim stanicama koštane srži, a ephrinB2 na osteoklastima. Pri međusobnom kontaktu između tih stanica dolazi do pojave dvosmjerne signalizacije što znači da se unutarstanične promjene odigravaju u obje stanice nositeljice imenovanih molekula. U ovom slučaju govori se o signalizaciji unaprijed, u stanici koja izražava Eph receptor, i unatrag u stanici koja izražava ephrin receptor (55). Rezultat te interakcije jest smanjenje djelovanja osteoklasta, te promocija djelovanja osteoblasta. U koštanim metastazama postoji umanjena interakcija ovih receptora fizičkim smanjenjem kontakta između stanica nositeljica, a uzrokovana prisustvom tumorskih stanica u koštanim

prostorna. To djelovanje tumorskih stanica pridonosi prevagi resorptivnih procesa, a združeno je s drugim mehanizmima povećane aktivnosti osteoklasta (56).

U humoralnoj stimulaciji funkcije osteoklasta tumorskim stanicama važnu ulogu zauzima ligand receptora aktivatora nuklearnog čimbenika  $\kappa$ B (RANKL). Nalazi se usidren u membranu razni razvojnih stadija osteoblasta i osteocita ili izlučen kao topljivi produkt tih istih stanica. Djelovanje mu je posredovano receptorom aktivatorom nuklearnog čimbenika  $\kappa$ B (RANK), koji se nalazi na prekursorima osteoklasta (7). Vezanje RANKL za RANK pokreće unutarstaničnu kaskadu koja uključuje vezanje i aktivaciju više čimbenika povezanih s receptorom za TNF (TRAF), te nizvodnu aktivaciju brojnih unutarstaničnih signalnih puteva: NF $\kappa$ B, NFATc1, c-os, c-Jun, Mitf. Njihovim djelovanjem pokreće se transkripcija efektoru važnih za djelovanje osteoklasta:  $\alpha_v\beta_3$  integrina, katepsina K, kalcitoninskog receptora, TRAP. Uloga ovih efektoru ključna je u povećanoj resorpciji kosti te su neki od njih postali i terapijski ciljevi (57). Na funkciju RANKL-a djeluje osteoprotegerin, član obitelji receptora čimbenika tumorske nekroze kojeg luče osteoblasti i stromalne stanice koštane srži, a koji vežući RANKL sprječava njegovu interakciju s RANK-om. Tako je zapravo opseg resorpcije određen odnosom koncentracija osteoprotegerina i RANKL-a (7).

Jedan od čimbenika koji potiče lučenje RANKL-a je PTHrP. Sličnost s paratiroidnim hormonom (PTH) čine identičnost prvih 8 od 13 aminokiselina te sličnost u trodimenzionalnoj strukturi, pa je djelovanje PTHrP-a posredovano receptorom za PTH (PTHr1) (58). Lučenje PTHrP-a primjećeno je u preko 90% metastatskih tumora dojke za koje su karakteristične koštane osteolitične koštane metastaze (7).

Na RANKL/RANK sustav djeluje i IL-11. U tumorskim bolestima glavni proizvođači su tumorske stanice, a u zdravoj koštanoj srži ima ulogu u regulaciji hematopoeze i u regulaciji upalnog odgovora. Potiče djelovanje osteoklasta povećavajući razinu RANKL-a, a smanjujući razinu osteoprotegerina kao i PTHrP, te tako neizravno djeluje na aktivnost osteoklasta (59).

Na diferencijaciju osteoklasta djeluje velik broj drugih interleukina, među kojima je dobro utvrđena uloga IL-1, IL-6, IL-8, IL-18. Djeluju na prekursore osteoklasta pospješujući diferencijaciju u osteoklaste, te na taj način povećavajući resorpciju koštanog tkiva (60). IL-3 djeluje i putem RANKL/RANK sustava, a također i direktno djelujući na prekursore osteoklasta, a u multiplog mijeloma aktivin A, čiji je izražaj potaknut djelovanjem IL-3, djeluje sinergistički sa istim IL-3 (61).

Snažnu ulogu u osteoklastogenezi ima i upalni protein makrofaga  $1\alpha$  (MIP- $1\alpha$ ). Djeluje kao kemotaktični čimbenik za prekursore osteoklasta, te inducira diferencijaciju osteoklasta mehanizmom neovisnim o RANKL-u. Njegova uloga od velike je važnosti za osteolitično djelovanje multiplog mijeloma. Potiče i izražaj adhezijskih molekula kao što je  $\beta_1$  integrin te tako povećava interakciju stanica multiplog mijeloma sa stromalnim stanicama koštane srži. Ta interakcija rezultira povećanom proizvodnjom IL-6, TNF- $\alpha$ , VEGF-a, RANKL-a od strane stromalnih stanica koštane srži, što osim vlastitog djelovanja na diferencijaciju osteoklasta djeluju povratno na tumorske stanice potičući njihovo djelovanje (56, 62).

U međustaničnoj komunikaciji između tumorskih stanica i osteoblasta, a posredovano djelovanjem MAP kinaza, inducirana pojačana ekspresija ciklooksigenaze tip 2 koja zatim stvara PGE<sub>2</sub> koji putem EP<sub>4</sub> receptora autokrino povećava lučenje RANKL-a te tako pospješuje diferenciranje osteoklasta. Uz to inducirano stvaranje PGE<sub>2</sub> tumorske stanice i same stvaraju taj prostaglandin koji djeluje proresorptivno (63).

TNF- $\alpha$  djeluje dvojako. Potiče diferencijaciju osteoklasta te inhibira funkciju osteoblasta. Luče ga tumorske stanice multiplog mijeloma i stromalne stanice koštane srži, a on sam potiče lučenje IL-6 od stromalnih stanica (56).

Uz već objašnjeno djelovanje aneksina II direktno na tumorske stanice, djeluje i na diferencijaciju osteoklasta potičući lučenje RANKL-a u stromalnim stanicama (29).

### 3.2. Inhibicija funkcije osteoblasta

Paralelno s procesima stimulacije osteoklastične aktivnosti, dominantne pojave u osteolitičnim koštanim metastazama, odvija se i proces inhibicije osteoblasta koji pridonosi ukupnom utjecaju tumorskih stanica na masu koštanog tkiva. Inhibicija osteoblasta posredovana je čimbenicima izlučenim iz tumorskih stanica.

Važnu ulogu u razvoju koštanih metastaza ima inhibitor Wnt/ $\beta$ -katenin signalnog puta Dickkopf-1 (DKK1). Ima ulogu u razvoju koštanog tkiva, a u patogenezi koštanih metastaza sudjeluje u razvoju osteoblastičnih i osteolitičnih procesa. Također ima dvojaku ulogu u metastazama tumora na različitim lokacijama: inhibira metastaziranje tumora dojke u pluća, modulirajući nekanonske Wnt signalne puteve te stimulira stvaranje koštanih metastaza modulirajući kanonske Wnt signalne puteve (64). U osteolitičnim koštanim metastazama, a pogotovo u multiplog mijeloma, pokazana je povećana sekrecija DKK1 te njegova uloga u inhibiciji diferencijacije osteoblasta smanjujući ekspresiju ključnog transkripcijskog faktora u diferencijaciji osteoblasta RUNX2. Uz djelovanje na diferencijaciju osteoblasta djeluje i stimulatивно na aktivnost osteoklasta smanjujući ekspresiju osteoprotegerina, a pojačavajući ekspresiju RANKL-a (65). U inhibiciji osteoblasta sudjeluju još dva inhibitora Wnt sinaglnih puteva sFRP2 i sklerostin. Njihova povećana produkcija također je otkrivena u multiplog mijeloma, a inhibicija njihove produkcije ima efekt smanjenja osteolitičnog učinka koštanih metastaza tumora dojke (56, 66).

IL-7 jest citokin koji inhibira diferencijaciju i funkciju osteoblasta. Zajedno s TNF- $\alpha$  inducira Gfi-1, transkripcijski supresor koji smanjuje transkripciju RUNX2 (67).



① inhibiraju osteoblaste

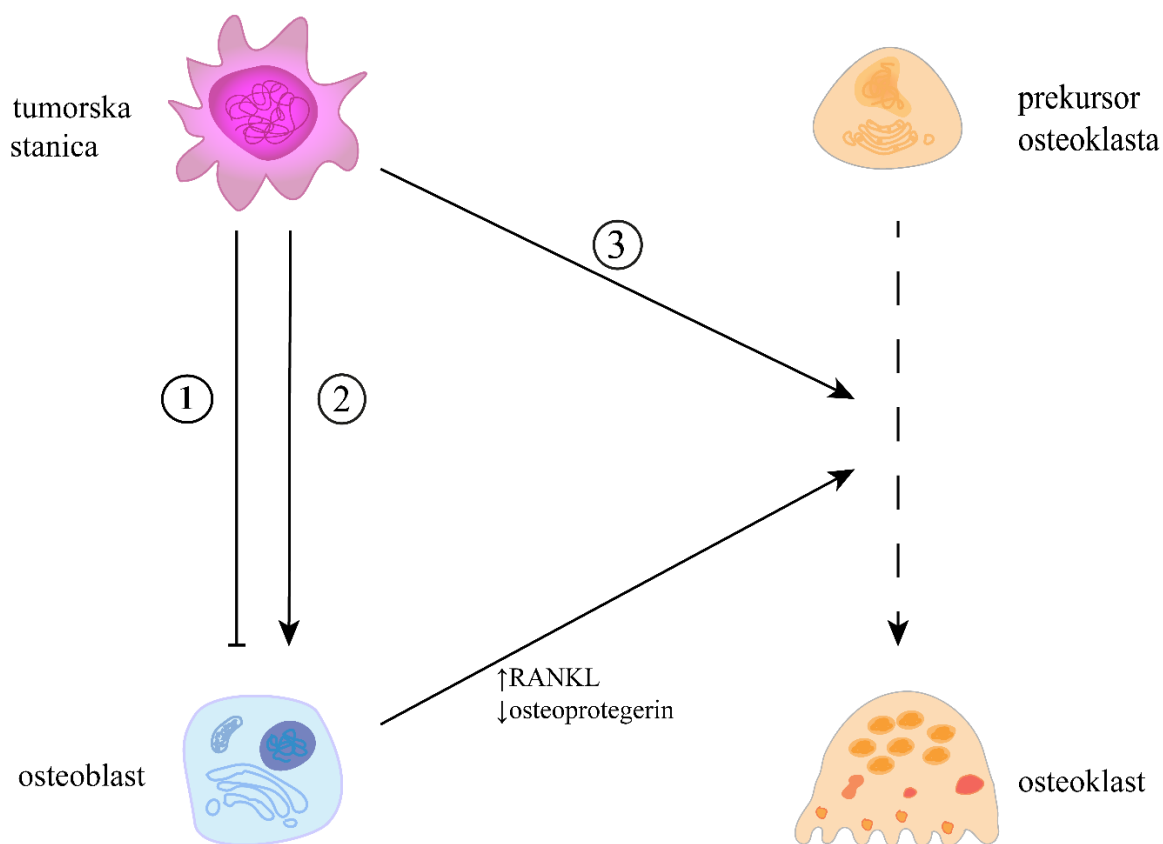
IL-7  
TNF- $\alpha$   
aktivin A  
DKK1  
sklerostin  
sFRP2

② stimuliraju osteoklaste ovisno o RANKL-u

PTHrP, MIP-1 $\alpha$ ,  
IL-3, IL-11,  
DKK-1, PGE<sub>2</sub>

③ stimuliraju osteoklaste neovisno o RANKL-u

IL-3, IL-8,  
IL-6, IL-17,  
IL-18, MIP-1 $\alpha$ ,  
aktivin A  
aneksin II



Slika 2. Prikaz međudjelovanja stanica pri prevagi osteolitičnog djelovanja

### 3.3. Mehanizam pozitivne povratne sprege u progresiji osteolitičnih metastaza

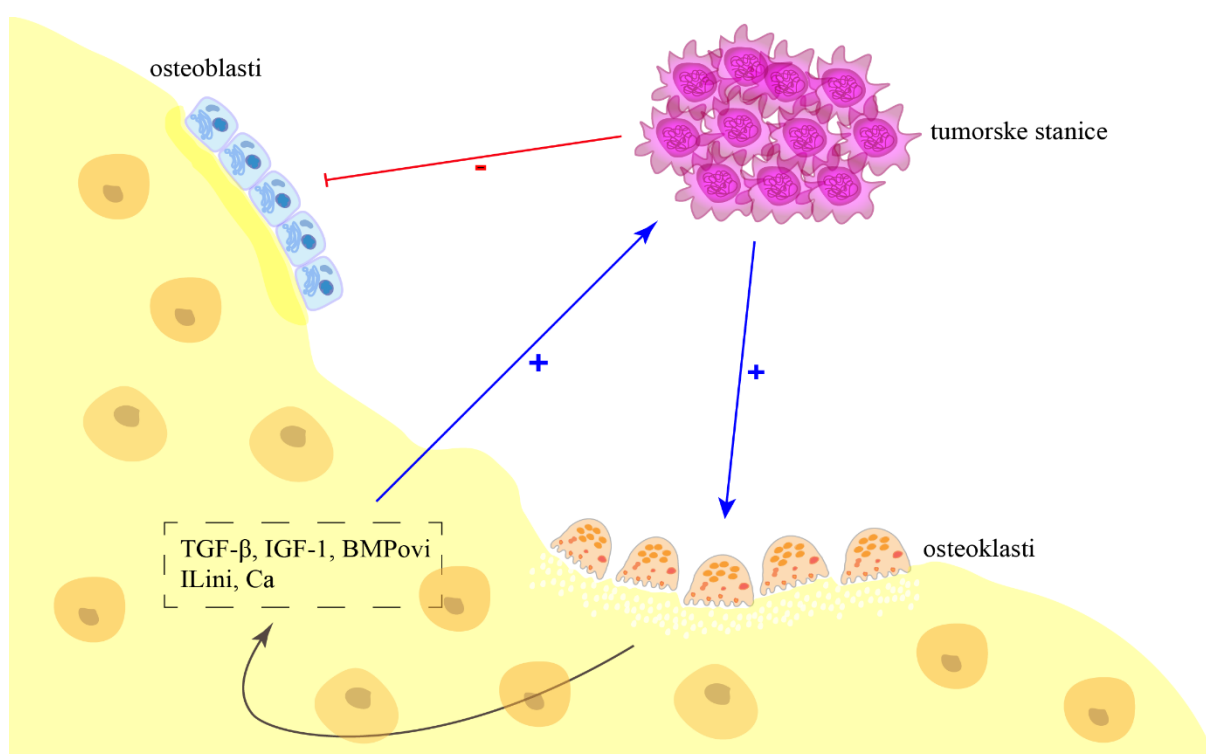
Tumori koji stvaraju osteolitične koštane metastaze upliću se na još jedan način u fiziološke procese u koštanom tkivu. To podrazumijeva iskorištavanje komunikacijskih puteva između osteoblasta i osteoklasta, koji služe kao kvalitativni, kvantitativni i vremenski regulatori djelovanja osteoblasta i osteoklasta u smislu ravnotežne regulacije između dva procesa koje te stanice izvršavaju. Te tumorske stanice otpočinu svoje djelovanje utječući na poticanje resorpcije i smanjenje izgradnje koštanog tkiva, a zatim se koriste produktima te resorpcije za potenciranje vlastitog napretka uspostavljajući začarani krug (*circulus vitiosus*) koji rezultira širenjem metastatske bolesti u koštanom tkivu te posljedičnim razaranjem tog tkiva (7).

Organski dio koštanog tkiva sastoji se od 98% kolagena tipa I i 2% nekolagenskih proteina. Osim već opisanih matricelularnih proteina, tu spadaju i brojni čimbenici rasta i citokini. Od njih po količini i važnosti ističu se TGF- $\beta$ , IGF-1, više vrsta BMP-a, INF- $\gamma$  te više vrsta IL-a. Od njih najvažniji za interakciju kosti s tumorskim stanicama jest TGF- $\beta$  (68).

TGF- $\beta$  (preciznije TGF- $\beta$ 1) nalazi se u mineraliziranom koštanom matriksu u dimernom obliku združen s drugim secerniranim proteinima, te je na taj način biološki inaktivan. Djelovanjem osteoklasta, točnije niskog pH i secerniranih enzima (MMP, katepsin), na koštani matriks TGF- $\beta$  se oslobađa i aktivira. Djelovanje mu je vremenski i prostorno različito. Djeluje kemotaktički na mezenhimalne stromalne stanice te inducira diferencijaciju osteoblasta, no u kasnijim fazama inhibira aktivnost osteoblasta. Na osteoklaste djeluje izravno i neizravno preko osteoblasta (69).

Tumorske stanice iskorištavaju ovaj regulacijski mehanizam izražajem receptora za čimbenike rasta iz koštanog matriksa, a kao posljedicu njihova djelovanja, pojačano luče PTHrP, IL-11, CTGF, CXCR4, MMP-1, sve čimbenike koji opet potiču djelovanje osteoklasta

a umanjuju djelovanje osteoblasta te nanovo potiču oslobađanje topljivih čimbenika rasta iz koštanog tkiva (68, 70). Osim čimbenika rasta, tumorske stanice reagiraju na kalcijeve ione također oslobođene u procesu resorpcije kosti. Izražavaju receptor za kalcij CaSR koji reagira i na najmanje promjene u izvanstaničnoj koncentraciji kalcija te potiče lučenje PTHrP-a uz djelovanje TGF- $\beta$  (71). Također, prolaktin ima ulogu u potenciranju mehanizma povratne sprege djelujući na diferencijaciju i aktivaciju osteoklasta neizravno, povećavajući RANKL/OPG omjer preko djelovanja na osteoblaste, te djelujući na tumorske stanice koje posjeduju prolaktinski receptor, a u odgovoru na prolaktin luče SHH koji stimulira osteoklaste izravno (72).



Slika 3. Mehanizam pozitivne povratne sprege u razvoju osteolitičnim metastaza

## 4. Osteoblastične metastaze

Druga krajnost nasuprot dobro istraženih osteolitičnih metastaza jesu osteoblastične metastaze. Susreću se ponajprije u karcinoma prostate, ali i u sitnostaničnog karcinoma pluća, Hodgkinova limfoma, te meduloblastoma (6). Njihova patogeneze nije ni izbliza toliko istražena kao što je to slučaj sa osteolitičnim metastazama, a čini se da je njihov razvoj uvjetovan mehanizmina koji sudjeluju u normalnom razvoju koštanog tkiva, dakle tumorske stanice djeluju mehanizmima i čimbenicima kojima se kost razvija u fiziološkim uvjetima te u ovom slučaju donose prevagu procesa izgradnje. Iako je koštana masa povećana, funkcijska struktura kosti je oslabljena te je povećan broj lomova tako promijenjene kosti (56).

### 4.1. Prevaga osteoblastičnih procesa

Tumorske stanice koji stvaraju osteoblastične metastaze luče brojne čimbenike koji povećavaju broj i aktivnost osteoblasta. Takav je i čimbenik rasta iz trombocita (PDGF), dimerni peptid građen od A i B jedinice. Može biti lučen kao AA, AB ili BB peptid. BB peptid identificiran je kao čimbenik koji inducira diferencijaciju i aktivnost osteoblasta u koštanim metastazama tumora prostate (73). Iako ne potpuno razjašnjeno, fibroblastni čimbenici rasta (FGF) imaju važnu ulogu u povećavanju aktivnosti osteoblasta. FGF1 i FGF2 povećavaju aktivnost osteoblasta, a FGF2 još i smanjuje aktivnost osteoklasta (74). Vaskularni endotelni čimbenik rasta (VEGF) ima dvojaku ulogu u razvoju koštanih metastaza, osim utjecaja na angiogenezu, potiče i aktivnost osteoblasta (75).

U osteoblastičnom odgovoru na tumorske stanice ulogu imaju i IGF-I i IGF-II. Iako samo djelovanje IGF-a nije dovoljno za osteoblastični učinak, uočena je povišena razina IGF-a u agresivnijih tumora, te niža razina IGFBP-a koji negativno utječu na učinak IGF-a (76). Koštani morfogenetski proteini (BMP), koje luče tumorske stanice imaju stimulatívni učinak

na stvaranje kosti, i to pogotovo BMP 6, 7 i 4. Uz učinak na osteoblaste imaju i ulogu u angiogenezi (75).

Za karcinome prostate dokazana je ekspresija mRNA za Wnt 3a, 7b i 10b koji su prepoznati u kanonskim putevima Wnt signalizacije, a koja ima ulogu u diferencijaciji i proliferaciji osteoblasta. Budući da je u primarnim tumorima i ranim metastazama tumora prostate dokazana i ekspresija Wnt inhibitora DKK1, a za razliku od agresivnih osteoblastičnih metastaza, izvodi se zaključak da prevagu izgradnje ili razgradnje kosti određuje ravnoteža između inhibicije i potenciranja Wnt signalnih puteva (77).

U poticanju osteoblastične aktivnosti sudjeluje i endotelin 1 (ET1), za kojeg se pretpostavlja da ga luče tumorske stanice, a on preko svojih receptora ET<sub>A</sub>R smanjuje sekreciju DKK1, a povećava sekreciju Wnt stimulirajućih čimbenika (78).

U metastazama tumora prostate dokazano je lučenje PTHrP-a. To se čini kontraintuitivno, budući da djelovanje tog peptida temeljito dokazano usmjerava djelovanje metastaza prema osteolitičnom fenotipu (70). Najuvjerljivije i najprihvatljivije rješenje ovog paradoksa jest činjenica da je NH<sub>2</sub>-terminalni kraj PTHrP-a strukturno vrlo sličan ET1, a pod djelovanjem enzima izlučenih od tumorskih stanica struktura PTHrP-a je modificirana te taj slijed sličan ET1 dolazi do pojačanog izražaja (79). Postoji i objašnjenje da PTHrP također djeluje na interakcije između tumorskih stanica i okolinskih stanica u koštanom tkivu, te na neki nedovoljno definirani način usmjerava djelovanje metastaza prema osteoblastogenezi (80).

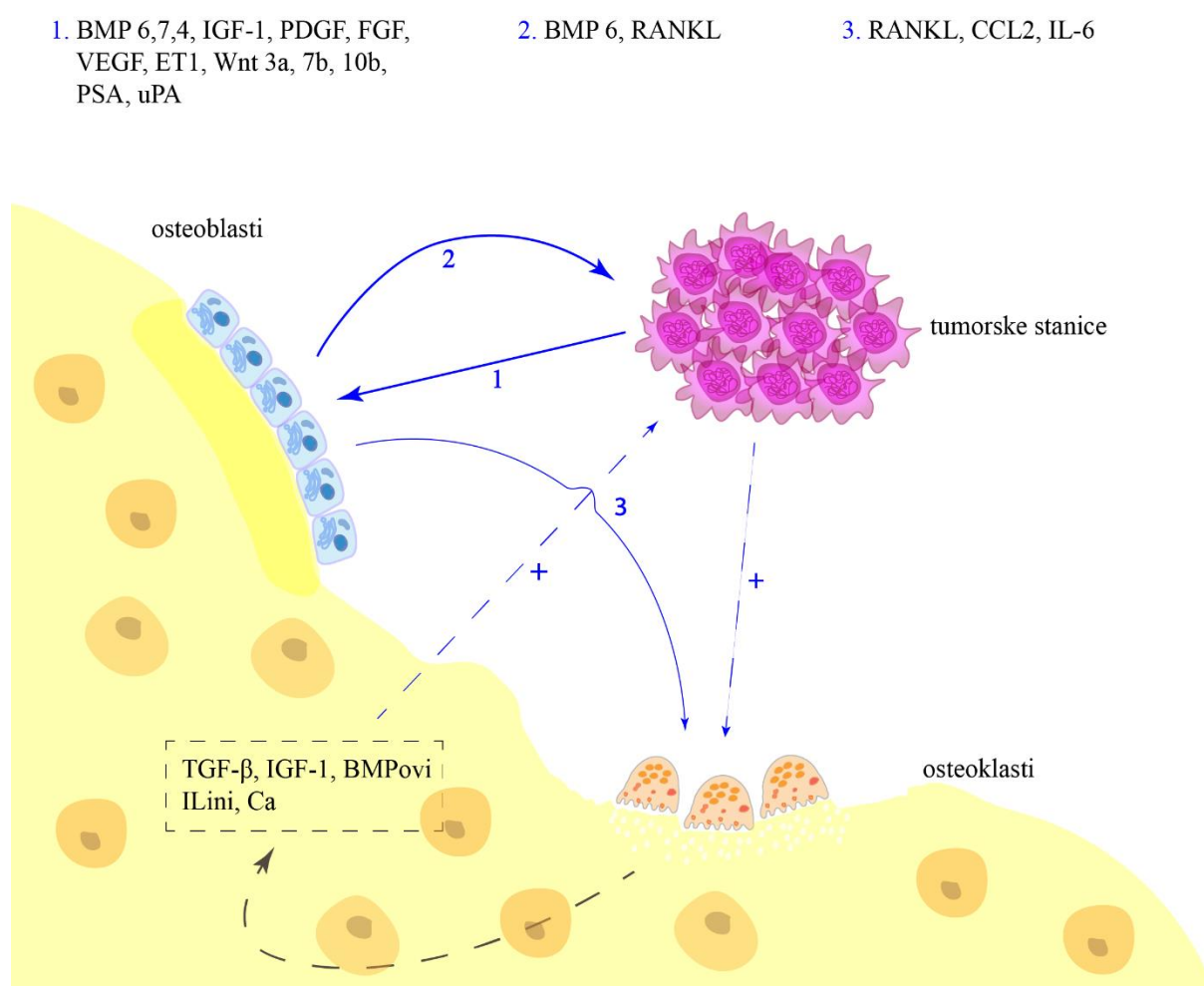
Stanice tumora prostate luče i druge čimbenike koji nisu uključeni u normalni razvojni put kosti već su dio prostatičnog programa ekspresije. Takvi su urokinazni aktivator plazminogena (uPA) i prostata specifični antigen (PSA). uPA biva izlučen od tumorskih stanica u obliku visokomolekularnog uPA (HMW-uPA), koji nakon vezanja za receptora za uPA (uPAR) na tumorskim stanicama vrši proteolitičku aktivnost razgradnje izvanstaničnog matriksa, te pospješuje invazivnost tumorskih stanica. Zatim se HMW-uPA raspada na

niskomolekularni uPA i na amino terminalni kraj, koji se veže za uPAR na osteoblastima te pospješuje njihovu aktivnost. Također uPA djeluje i na inaktivne oblike TGF- $\beta$ , koje sintetiziraju osteoblasti, a namjenjeni su ugradnji u novostvoreni koštani matiks. Taj novooslobođeni TGF- $\beta$ , osim što ima ulogu u orkestraciji djelovanja osteoblasta i osteoklasta, djeluje i izravno na tumorske stanice kao i npr. kod tumora dojke. uPA također i pospješuje djelovanje IGF-I, razgrađujući negativn regulatore njegove aktivnosti IGFBP (81, 82). PSA, serinska proteaza vrši već napomenutu ulogu odcjepljivanja osteoblastičnih fragmenata od inače osteolitičnog PTHrP-a, te također sudjeluje u oslobađanju aktivnih oblika čimbenika rasta kao i uPA (83, 84).

## 4.2. Mehanizam pozitivne povratne sprege u progresiji osteoblastičnih metastaza

Nasuprot sveprisutnim opisima pozitivne povratne sprege u osteolitičnim metastazama, malo je govora, o takvim procesima u osteoblastičnih metastaza, iako je takav način promatranja siguran gotovo kao i onaj u osteolitičnim procesima. Na početku razvoja metastatske bolesti u kostima tumorske stanice luče tvari koje potiču aktivnost osteoblasta (opisani u prethodnom tekstu). Odgovor osteoblasta je stvaranje novog koštanog tkiva, što bi u isključivo toj aktivnosti ubrzo fizički ograničilo razvoj tumorskih stanica, i iako je primjećen sporiji razvoj osteoblastičnih metastaza u usporedbi s osteolitičkim, teorijski i praktično je utvrđeno da nije samo osteoblastična aktivnost prisutna. Povećavajući osteoblastičnu aktivnost, istovremeno se povećava i aktivnost osteoklasta (RANKL/RANK sustavom, CCL2, IL-6), te je istovremeno prisutna i razgradnja koštanog matriksa što dovodi do oslobađanja čimbenika rasta iz razgrađene kosti kao i kod osteolitičnih metastaza (82, 85). Specifičnim obrascem izlučivanja tvari tumorske stanice potiču aktivnost osteoblasta, ali i aktivnost osteoklasta, no resultantna je aktivnost izražena kao stvaranje koštanog tkiva (82). Imajući taj zbirni opis na umu, mogu

se opisati dva kraka povratnog poticajnog djelovanja na tumorske stanice koji zatvaraju krug pozitivne povratne sprege. Jedan posljedica razgradnje djelovanjem osteoklasta, a drugi djelovanjem čimbenika iz osteoblasta. RANKL kojeg luče osteoblasti djeluje i na tumorske stanice tumora prostate putem RANK-a. Koštani morfogenetski proteini (BMP) lučeni iz osteoblasta također imaju stimulatívni učinak na same tumorske stanice (82). Tako *circulus vitiosus* i ovdje sudjeluje u samopojačanju tumorskog procesa.



Slika 4. Međudjelovanje tumorskih stanica i koštanog tkiva pri osteoblastičnim metastazama

## 5. Rani razvoj koštanih metastaza

Do sada opisani mehanizmi, a koji se tiču koštanog tropizma tumorskih stanica i mehanizama djelovanja uspostavljenih metastatskih žarišta u kosti, fragmenti su jedinstvenog patogenetskog tijeka koji započinje na mjestu primarnog tumora, a završava potpuno uspostavljenim sustavom metastaza u kostima. Zbog praktičnosti prikaza i jasnoće kazivanja, tek sada će ti opisani mehanizmi biti uklopljeni u širu, potpuniju sliku cjelovitog procesa.

Tumorske stanice koje se nalaze u cirkulaciji nazivaju se cirkulirajuće tumorske stanice. Njihov nastanak rezultat je zbira procesa na mjestu primarnog tumora a koji uključuje promjenu svojstava tumorskih stanica koja se naziva epitelno-mezenhimska tranzicija, i podrazumijeva smanjenje izražaja epitelu karakterističnih molekula (klaudin, citokeratin, E-kadherin), a povećanje izražaja mezenhimalnim stanicama karakterističnih molekula (N-kadherin, vimentin, fibronektin, aktin). Na tom mjestu također sudjeluju i brojni enzimske sustavi koji omogućuju tumorskim stanicama ulazak u cirkulaciju (86, 87). Iako se te cirkulirajuće tumorske stanice mogu otkriti u uzorcima periferne krvi i smatraju se lošim prognostičkim čimbenikom, imaju veliki, za sada još neiskorišten, potencijal u analizi tumorskih osobina (88). Tumorske stanice koje su prevladale sve prepreke od mjesta primarnog tumora do ciljnog organa (lokalnu invaziju, intravazaciju, preživljavanje u cirkulaciji, zaustavljanje u mikrocirkulaciji, ekstravazaciju), a još nisu uspostavile svoje djelovanje na tom udaljenom mjestu nazivaju se diseminirane tumorske stanice. Njihov nalaz u koštanoj srži dokazan je kao loš prognostički čimbenik s obzirom na stvaranje koštanih metastaza, ali samo u tumorima dojke i prostate, a ne u drugim tumorima (89, 90). Ti nalazi upućuju da iako je diseminacija u koštano tkivo nužan događaj za razvoj koštanih metastaza, on nije odlučujući. Dakle termin diseminirane tumorske stanice nije istoznačan terminu mikrometastaze, pogotovo kada se uzme u obzir da je smještaj cirkulirajućih tumorskih stanica u koštano tkivo (no ne i u pluća i mozak) vrlo vjerojatno



pasivan proces, zbog već opisanih karakteristika koštanih krvnih žila, pa sam nalaz tumorskih stanica u koštanoj srži, koji ih svrstava u skupinu diseminiranih tumorskih stanica, ne implicira širenje tumorske bolesti na kosti. Tu tvrdnju podupire i činjenica da čak 32% pacijenata u vrijeme operacije primarnog kolorektalnog karcinoma ima diseminirane tumorske stanice u koštanoj srži, a razvoj metastatske koštane bolesti je vrlo rijedak događaj za tu bolest (91).

Treba spomenuti i važnost karcinomskih matičnih stanica. Smatraju se podskupinom diseminiranih matičnih stanica, koje karakterizira niska mitotska aktivnost, otpornost na kemoterapeutike ali i ishodišni klon stanica od kojih nastaju svi brzodijeleći raznoliki klonovi tumorskih stanica (92). Postoje i u epitelnom i u mezenhimalnom obliku što podrazumijeva da je i mezenhimalno epitelna tranzicija jedan od procesa koji se odigrava u koštanoj srži, a posreduje aktivaciju karcinomskih matičnih stanica (93). Identificirane su u progresiji brojnih tumora, pa tako i tumora dojke i prostate, a prepoznaju se po adhezijskoj molekuli CD44 (94), a karakterizirane su visokim izražajem Oct4, SOX2, NANOG, Klf4 transkripcijskih faktora.

Budući da svi terapijski modaliteti dosad u liječenju koštanih metastaza nisu pokazali željene rezultate pozornost je usmjerena na ovo, u različitim tumorima različito, razdoblje između pojave diseminiranih tumorskih stanica u kosti i klinički izraženih koštanih metastaza. To razdoblje uključuje razdoblje „uspavanosti“ tumorskih stanica (engl. *tumor cell dormancy*) i razdoblje aktivacije i progresije bolesti u klinički zamjetljive koštane metastaze.

U svakom preciznijem razmatranju koštanog tkiva, a posebice koštanih metastaza potrebno je definirati pojam niše, a to je lokalni tkivni mikrookoliš koji održava i regulira jedan ili više tipova matičnih ili progenitorskih stanica. Budući da je koštana srž vrlo dugo poznata po većem broju takvih tipova stanica postojanje takvog mikrookoliša je sigurno, te razlikujemo perivaskularnu i endostealnu nišu. Perivaskularna niša smještena je u neposrednoj okolini koštanih sinusoida, a naseljena je sinusoidalnim endotelom, pericitima, hematopoetskim matičnim stanicama, stromalnim stanicama koštane srži, retikularnim stanicama (CAR stanice)

te drugima, a biokemijski je karakterizirana visokim sadržajem CXCL12 kemokina. Endostealna niša smještena je u neposrednoj blizini površine mineraliziranom koštanoj matriksa, a u njoj osim stromalnih stanica koštane srži, obitavaju i osteoklasti i različiti razvojni stadiji osteoblasta. Također je mjesto ranog razvoja stanica limfoidne loze. Takva podjela ne uvjetuje isključiv smještaj tumorskih stanica u jednu od navedenih već upućuje na raznolikost čimbenika koji djeluju na tumorske stanice, odnosno na različitost mikrokoliša koji djeluje na stanice smještene u koštanoj srži (95).

## 5.1. Mehanizmi „uspavanosti“ tumorskih stanica

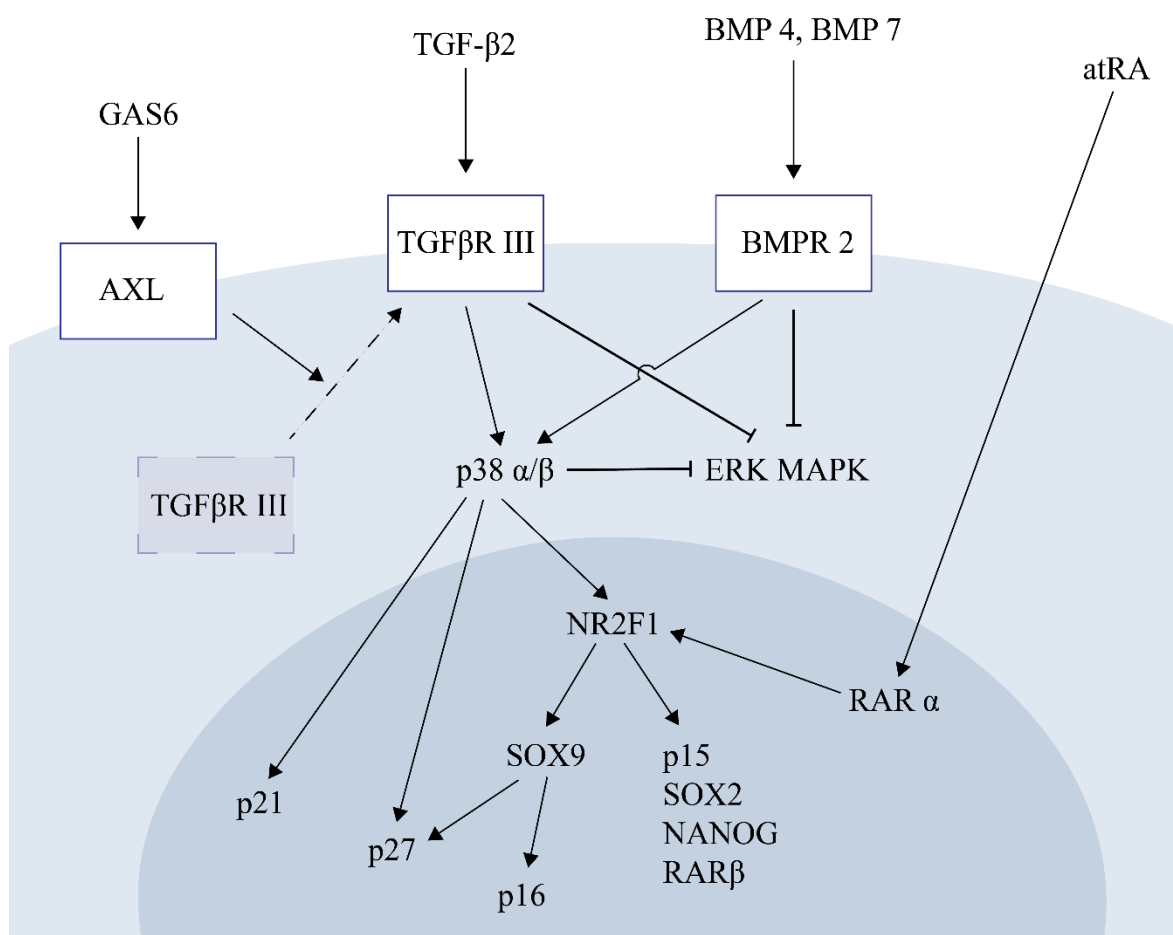
Stanje „uspavanosti“ tumorskih stanica opisuje stanice u G0/G1 fazi staničnog ciklusa (96). To stanje karakterizirano niskom metaboličkom aktivnošću omogućuje razvoj metastatske bolesti mnogo godina od razvoja primarnog tumora, a u isto vrijeme prilagodbu i otpornost na kemoterapeutike, odnosno zaštićenost tumorskih stanica od liječenja ali i od imunološkog sustava domaćina. Na pitanje kako se postiže to stanje, postoji više mogućih odgovora, a najuvjerljiviji je 1. Mikrokoliš koštanih niša modulira aktivnost tumorskih stanica, također moguć je i odgovor 2. Karakteristike primarnog tumora određuju stanje „uspavanosti“ bez obzira na ciljni organ, i 3. Stanje „uspavanosti“ ovisi o vremenu odvajanja stanica od primarnog tumora budući da se kroz vrijeme mijenjaju karakteristike tumorskih stanica (97). Također se pod tim pojmom osim ove „uspavanosti“ u užem smislu (stanice u G0 ili G1 fazi, stanična „uspavanost“), često susreću još dva procesa stagnacije tumorskog rasta: takozvana angiogena „uspavanost“ pri kojoj je metastatska tumorska masa stalnog broja stanica i volumena zbog ravnoteže između novonastalih stanica djeljenjem i propadanja stanica zbog nedostatne prožiljenosti i imunološka „uspavanost“ zbog ravnoteže između novonastalih stanica i stanica uništenih imunološkim sustavom (98).

Pri promatranju „uspavanih“ stanica, jedan obrazac unutarstaničnog signaliziranja jest iznikao kao zajednički, a to je specifična ravnoteža između dva signalna puta. Jedan je p38 $\alpha$ / $\beta$  MAPK signalizacija, a drugi je ERK MAPK signalizacija. U „uspavanih“ stanica prevagu odnosi p38 MAPK aktivnost, a ERK MAPK put je inhibiran i obratno za aktivne tumorske stanice. p38 MAPK signalni put konačno djeluje na stanični ciklus inhibicijom CDK4, aktivacijom p16 i p53 (98, 99). JNK signalni put može djelovati dvojako na „uspavanost“ tumorskih stanica, te iako je pokazana kao proliferativni čimbenik, i za „uspavanost“ potrebna aktivacija (100, 101). Također MKK4, uzvodni čimbenik od p38 u MAPK signalnom putu je dokazani poticatelj „uspavanosti“ (102). Uz djelovanje p38, u regulaciji uspavanosti važnu ulogu ima i jezgreni hormonski receptor i transkripcijski regulator NR2F1, koji aktiviraju brojne transkripcijske faktore NANOG, SOX2, SOX9, RAR $\beta$  a čijim se djelovanjem, posredovano inhibitorima o ciklinu ovisnih kinaza p15, p16, p27, u stanicama pokreću transkripcijski programi „uspavanosti“. Učinak tog transkripcijskog regulator čini se da obuhvaća epigenetske mehanizme pomjene ekspresije gena, a isto tako i sniženu aktivnost *myc* onkogen (97, 103).

U trenutku ekstravazacije, tumorske stanice mezenhimalnog fenotipa prolaze kroz perivaskularnu, a zatim i endostealnu nišu. Budući da su te niše bogate čimbenicima koji reguliraju fenotip hematopoetskih matičnih stanica, tumorske stanice postaju izložene tim čimbenicima i same reagiraju vrlo slično stanicama koštane srži. Jedan od tih čimbenika je specifični protein 6 za regulaciju rasta stanica (GAS6), kojeg luče osteoblasti. Veza između tumorskih stanica i osteoblasta posredovana aneksinom II, potiče ekspresiju tirozin kinaznih receptora AXL, Sky, Mer na tumorskim stanicama, čiji je ligand upravo GAS6. na taj način osigurana je signalizacija GAS6/AXL koja je dokazani inicijator „uspavanosti“ tumorskih stanica (104, 105). Uz GAS6 u koštanoj srži luče se i TGF- $\beta$ 2 i trans-retinoična kiselina (atRA), te BMP 4 i BMP 7. Svi oni imaju dokazano potičuće djelovanje na p38 MAPK signalni put te tako djeluju na tumorske stanice inducirajući „uspavanost“ (106, 107). Ovi čimbenici imaju

prevladavajuću ulogu u djelovanju na tumorske stanice smještene u endostealnoj niši, no postoje i mehanizmi koji pospješuju „uspavanost“ i u perivaskularnoj niši. Mirujući endotel luči trombospondin 1, koji inducira program „uspavanosti“ u tumorskim stanicama, a proliferirajući endotel luči TGF- $\beta$ 1 i periostin koji uzrokuju aktivaciju tumorskih stanica. Tako stanice smještene u perivaskularnoj niši dobivaju signale koje ih usmjeruju u „uspavanost“ ili metaboličku i mitotsku aktivnost (108).

Uz već spomenute načine prekidanja „uspavanosti“ putem TGF- $\beta$ 1 i periostina iz pupajućih krvnih žila, VCAM-1 ima odlučujuću ulogu. Njegova ekspresija potaknuta je djelovanjem NF $\kappa$ B, čija je aktivnost stimulirana djelovanjem RANKL-a, PTH(rP)-a, IL-6. Interakcija VCAM-1 i integrina  $\alpha_4\beta_1$  na prekursorima osteoklasta te tako promoviraju osteoklastogenezu (109). Također su važni i enzimski sustavi koji oslobađaju čimbenike rasta iz koštanog matriksa kao što je ADAMTS1 i MMP1 (110). Sličnu ulogu ima i MMP7 djelujući stabilizirajuće na RANKL (111). Tumorske stanice luče i heparanazu koja nepoznatim mehanizmom promiče osteoklastičnu aktivnost (112), a hipoksijom induciran izražaj lizil oksidaze može, osim što djeluje na strukturu kolagena u izvanstaničnom matriksu, i nezavisno od toga potencirati osteoklastičnu aktivnost (113). Osteoklastogeneza potiče reaktivaciju „uspavanih“ tumorskih stanica te progresiju metastatskog procesa kroz već opisane mehanizme. Dakle, boravak tumorskih stanica u perivaskularnoj niši s mirujućim endotelom i endostealnoj niši bez resorptivnih procesa pogoduje stanju „uspavanosti“, a pupanje endotela i pospješena resorpcija kosti posredovana tumorskim stanicama ili fiziološkim mehanizmima prekida to stanje te dovodi do napretka metastatskog procesa.



Slika 5. Shema dijela mehanizma pokretanja „uspavanosti“ tumorskih stanica

## 5.2. Uloga miRNA u koštanim metastazama

Od mnoštva podskupina RNA u stanici u ovoj tematici ističu se mikro RNA (engl. *microRNA*, miRNA). Biologija tih RNA molekula pokazala se kao vrlo važan čimbenik u regulaciji izražaja proteina na više razina. To su male (oko 22 nukleotida dugačke) RNA koje se u citoplazmi vežu za mRNA te koče njihovu translaciju u proteine i/ili ih usmjeravaju u razgradnju. Procjenjuje se da je oko 30% protein kodirajućih gena, odnosno njihove mRNA, kontrolirano na neki način nekom od mnogobrojnih miRNA (114). kodirajuće sekvence za miRNA smještene su uglavnom u nekodirajućim djelovima DNA gdje također podliježu preciznoj regulaciji transkripcije svim uobičajenim mehanizmima. Nakon transkripcije podvrgnute su strukturnoj prilagodbi u jezgri posebnim enzimom (Drosha) tvoreći strukturne

motive slične ukosnici (*hairpin*), zatim su transportnim sustavom premještene u citoplazmu gdje su ponovno strukturno modificirane drugim enzimskim sustavom (Dicer). U citoplazmi se vežu za ciljane mRNA po principu djelomične podudarnosti sekvenci, te tvore strukturne oblike nazvane RISC (engl. *RNA-induced silencing complex*) koje sprječavaju translaciju (115). Sudjeluju u regulaciji staničnog rasta, diferencijacije, apoptoze i odgovora na stres. Djeluju po načelu tkivne specifičnosti i pleiotropnosti učinaka (116).

U biologiji tumora miRNA su otkrivene u podlozi brojnih procesa: regulaciji protoonkogeni i tumor supresijskih gena, regulaciji epitelno mezenchimске tranzicije te komunikaciji između tumorskih i tkivnih stanica putem egzosoma. Tako je primjerice u tumorima dojke pokazana veza između miR-10a i miR-10b i koštanih metastaza iako nije točno utvrđena njihova ciljna miRNA. S druge strane je utvrđeno da su te miRNA regulirane od transkripcijskog faktora RUNX2, a miR-10b od transkripcijskog faktora TWIST1. Dakle miRNA jest dio regulacijskih mehanizama poznatih učesnika u metastatskom procesu, kao ova dva navedena (117, 118). Nadalje utvrđeno je i da je izražaj miR-135 i miR-203 povezan sa smanjenom ekspresijom RUNX2 u metastatskim tumorima dojke, a također i potencijalnu terapijsku primjenu tih miRNA u zaustavljanju progresije primarnog tumora i koštanih metastaza (taipaleenmaki2015). Ovo su samo pokazni primjeri brojnih identificiranih miRNA koje potiču procese koštanih metastaza (120), no isto tako postoje i miRNA koje su povezane sa supresijom tih procesa kao na primjer miR-33a čiji je cilj PTHrP (121), ili miR-335 čiji je cilj RANKL (122).

Osim djelovanja miRNA unutar tumorskih stanica, postoji i proces prijenosa miRNA iz tumorskih u netumorske stanice putem egzosoma. Egzosomi su kuglasti membranski mjehurići u promjeru veliki 40-100 nm. U sastavu membrane imaju brojne fuzijske proteine (kao Rab GTPaze, koneksini), HLA molekule razreda I i II i brojne druge transmembranske protein. Nastaju iz unutarstaničnih endosoma i treba ih razlikovati od drugih secerniranih lipidnih

mjehurića mikrovezikula i ektosoma (123). Tako se egzosomi izlučeni iz tumorskih stanica karcinoma dojke spajaju s endotelnim stanicama te u njih unose miR-105 koja smanjuje ekspresiju proteina u sastavu čvrstih spojeva ZO-1 te na taj način smanjuju povezanost endotelnih stanica krvnih žila i olakšavaju prolaz tumorskih stanica kroz stijenku krvne žile (124). Još je jedan primjer miR-122 prenešena egzosomima iz tumorskih stanica metastaza u stanice niše koja umanjuje količinu piruvat kinaze M2, smanjuje izražaj GLUT1 transportera te na taj način osigurava metaboličko prvenstvo i obilje supstrata za tumorske stanice (125). Egzosomi daju još jednu zanimljivu dimenziju razumijevanju procesa razvoja metastaza te potencijalnu terapijsku mogućnost u budućnosti.

### 5.3. Utjecaj imunosnih stanica

Odnos između tumorskih stanica i stanica imunološkog sustava je višestran i ima veliku ulogu u kontroli razvoja koštanih metastaza. Tumorske stanice proizvode veliku količinu antigena koje obrađuju i prezentiraju dendritičke stanice, te u suradnji s citotoksičnim i pomagačkim T limfocitima pokreću odgovor protiv tumorskih stanica. One tumorske stanice koje izbjegnu djelovanju citotoksičnih T limfocita, podložne su djelovanju NK stanica. Unatoč tom naizgled učinkovitom sustavu, koji doista eliminira veliki broj tumorskih stanica, taj odnos ima i drugu stranu koja dopušta razvoj tumorskog procesa (126, 127).

Djelovanje tumorskih stanica na dendritičke stanice usmjerava ih u regulacijski fenotip čijim su djelovanjem zahvaćeni i limfociti T. Tumorske stanice luče TGF- $\beta$  i PGE<sub>2</sub>, koji u dendritičkim stanicama pokreću izlučivanje brojnih čimbenika, kao što su VEGF, IL-10, NO, TGF- $\beta$ , arginaza I. Ti čimbenici djeluju na CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> limfocite T te umanjuju njihovu funkciju (127, 128, 129). Uloga makrofaga u interakciji s tumorskim stanicama mnogo je opisivana. Važna je polarizacija makrofaga u M1 populaciju koja se smatra zaslužna za protutumorski učinak makrofaga, a luči IL-12, i M2 populaciju, koja se još i naziva tumorima

pridruženi makrofazi, a koji luče pretežno IL-10, te potiču tumorsku progresiju (130). veza između tumorskih stanica i monocita/makrofaga posredovana je VCAM-1/ $\alpha_4$  integrin parom i CCL2/CCR2 kemokinom i kemokinskim receptorom. CCL2 kemokin djeluje kemotaktično na CCR2+ monocyte te pogoduje infiltraciji makrofaga u masu tumorskih stanica, a VCAM-1 u vezi s  $\alpha_4$  integrinom pokreće u tumorskim stanicama posredstvom PI3K-AKT signalnog puta antiapoptotski učinak (131, 132). U odnosu s tumorskim stanicama su i supresijske stanice mijeloidnog porijekla (MDSC). Te stanice se u fiziološkim uvjetima diferenciraju u dendritičke stanice, makrofage i granulocite, a u tumorskoj okolini u osteoklaste ili u stanice sa supresijskom ulogom koje suprimiraju funkciju T limfocita (133). Tumorske stanice koje luče GM-CSF, G-CSF, IL-6 pospješuju stvaranje MDSC iz matičnih stanica u koštanoj srži (134). Te stvorene MDSC stvaranjem arginaze I suprimiraju djelovanje citotoksičnih T limfocita, a i pospješuju diferencijaciju Treg populacije limfocita (135). GM-CSF koji luče tumorske stanice potiče i stvaranje onkostatina M kojeg stvaraju neutrofili, a koji potiče diferencijaciju osteoklasta, pa tako i neutrofili imaju ulogu u razvoju koštanih metastaza (136). Već spomenuti Treg limfociti imaju inhibitorno djelovanje na NK stanice što ima važnu ulogu u početnoj migraciji tumorskih stanica budući da NK stanice imaju važnu protutumorsku ulogu (137). U koštanim metastazama primjećena je i prevaga Th17 nad Th1 limfocita. IL-17 posredstvom RANKL/RANK sustava povećava stvaranje osteoklasta. IL-17 također pospješuje rast tumorskih stanica tumora prostate (138, 139). Uobičajeno NK stanice vežu se za tumorske stanice preko NKG2D/NKG2-L i TRAIL/DR4 parova što pokreće apoptozu u tumorskim stanicama, no u tumorskim stanicama postoji sustav koji ometa to djelovanje a to je izražaj C2GnT (engl. *Core2  $\beta$ -1,6-Nacetylglucosaminyltransferase*) što predstavlja loš prognostički čimbenik (140).



## 6. Klinički primjenjene spoznaje

Koštane metastaze iziskuju značajne napore u liječenju pacijenata s tumorskim bolestima. One su klinički vrlo problematične, postajući nakon uklanjanja primarnog tumora glavni izvor poteškoća uzrokujući bol, otežanu pokretljivost, patološke frakture, kompresiju spinalne moždine, aplaziju koštane srži i hiperkalcemiju (141). Zbog toga je razumijevanje mehanizama kao zahvatnih mjesta potencijalnih terapijskih sredstava vrlo izražen motiv istraživanja tumorske biologije i jasno postavljen cilj. Međutim, rezultati su još uvijek ograničeni na ublažavanje simptoma i usporavanje napretka bolesti te nisu lječidbeni.

### 6.1. Registrirane terapijske opcije

Bisfosfonati su analozi pirofosfata s visokim afinitetom vezanja za kalcij, odnosno za hidroksiapatit, pogotovo u tijeku pregradnje. Djeluju poglavito na osteoklaste izazivajući inhibiciju njihova metabolizma i apoptozu. Točan mehanizam ovisi o građi. Bez dušični bisfosfonati (kao što je klodronat) su metabolizirani u analoge ATP-a koji inhibiraju mitohondrijsku adenin nukleotid translokazu te na taj način izazivaju apoptozu poremećajem energijskog metabolizma na razini mitohondrija. Dušični bisfosfonati (npr. alendronat, ibandronat, zoledronat) inhibiraju farnezil pirofosfat sintazu, a to sprječavajući prenilaciju proteina i nakupljanjem uzvodnih enzimskih supstrata također izaziva apoptozu (142). Unatoč opterećujućim nuspojavama, bisfosfonati su još uvijek vrlo zastupljena terapijska opcija i pokazuju učinak smanjivanja kliničkih manifestacija bolesti, smanjivanja broja metastaza i smanjenog prožiljenja tumorske mase u kostima (143, 144).

Zbog vrlo važne i već vrlo dugo poznate uloge RANKL/RANK sustava u djelovanju koštanih metastaza, u razvoju terapije za koštane metastaze razvila se strategija inhibicije tog sustava. Budući da je RANK vrlo raširen u organizmu, pažnja je usmjerena na razvoj molekula

koje ciljaju RANKL. Isprva je stvorena OPG-Fc molekula, no zbog njenih antigenskih svojstava razvijeno je ljudsko monoklonalno protutijelo ciljano na RANKL (kao što je denosumab) (145). IgG2 protutijelo denosumab inhibira osteoklastogenezu i aktivnost osteoklasta te umanjuje resorpciju koštanog tkiva. U koštanim metastazama tumora dojke i prostate denosumab se pokazao učinkovitijim od zolendronata u odgađanju prvih kliničkih manifestacija tumorske bolesti, a u ostalih tumora se pokazao neinferiornim (146). budući da je RANK receptor također izražen i na ranim stadijima tumorskih stanica predložena je i mogućnost kemoprevencije karcinoma dojke u žena s potvrđenom BRCA1 mutacijom (147).

S obziroma na djelovanje RANKL-a, M-CSF-a, TNF- $\alpha$ , čije djelovanje posreduje mTOR, inhibitori mTOR-a su svrstani u terapijske strategije za koštane metastaze. Inhibicija mTOR-a uzrokuje povećanu ekspresiju OPG-a, apoptozu osteoklasta te vjerojatno pospješuje diferencijaciju osteoblasta (148, 149). Budući da im je djelovanje ispitano većinom kao dodatak bisfosfonatima, tako je njihova primjena rezervirana za uznapredovale stadije tumorskih bolesti (150).

Upotreba radijacije u liječenju tumorskih metastaza obuhvaća, osim klasičnih protokola zračenja koji su rezervirani za lokalizirane procese zbog teških nuspojava, upotrebu radionuklida.  $\beta$  emitirajući radionuklidi stroncij-89 i s bisfosfonatom konjugirani samarij-153, zbog širokog pojasa djelovanja  $\beta$  čestica imaju značajne nuspojave, te je njihova upotreba ograničena na paliativne slučajeve. Radij-223 je  $\alpha$ -emitirajući radionuklid, te je zbog manje prodornosti, a više energije  $\alpha$  čestica, pogodniji za sigurniju upotrebu. Učinak radionuklida posljedica je dvostrukih lomova DNA, koji se akumuliraju do letalne doze za izložene stanice (151).

## 6.2. Terapijske opcije u razvoju

Za funkciju osteoklasta od velike je važnosti cisteinska proteaza katepsin K, koja u prisutnosti niskog pH razgrađuje mineralizirani koštani matriks. U nastojanju sprječavanja koštane resorpcije razvijeni su inhibitori katepsina K *dutacatib*, *odanacatib*, *balicatib*. Iako su neke studije pokazale učinkovitost u inhibiciji koštane resorpcije, neke su studije prekinute zbog lošeg sigurnosnog profila tih tvari, ipak terapijski cilj još uvijek postoji (150, 152).

Protoonkogen c-Src (tirozin kinaza) je također identificiran kao terapijski cilj, zbog svoje uloge u diferencijaciji osteoklasta. U istraživanju su bosutinib, dasatinib, ponatinib, vandetanib. Zbog strukturne sličnosti sa brojnim drugim protein kinazama, odnosno križne aktivnosti, spektar djelovanja tih lijekova je doista širok te su uključeni u istraživanja u sklopu različitih tumorskih bolesti (153).

Protutijela specifična za sklerostin su još jedan mogući terapijski cilj. Sklerostin luče brojne tumorske stanice kao stanice tumora dojke i multiplog mijeloma te preko njegovog djelovanja inhibiraju osteoblaste. On je Wnt inhibitor čijim se djelovanjem utišavaju kanonski putevi Wnt signalizaciji. Budući da je Wnt signalizacija modulirana od brojnih čimbenika u patogenezi koštanih metastaza, a djelovanje često ima dvojake konotacije, oprez pri farmakološkom djelovanju je vrlo izražen (154). Protutijela specifična za DKK1, još jedan Wnt inhibitor, su isto tako u istraživanju kao terapijsko zahvatno mjesto u metastatskoj bolesti kostiju (155).

MET (c-Met) ili HGFR inhibitor *cabozantinib* (također inhibira i VEGFR2, AXL, KIT, RET), je proučavan kao inhibitor angiogeneze i tumorskog rasta u mnogim tumorskim bolestima. Djeluje također i na koštanu pregradnju pogodujući osteoblastičnoj aktivnosti (156).

## 7. Zaključak

Raznovrsni mehanizmi pridonose razvoju koštane metastatske bolesti. Njihovo razumijevanje uvelike nadmašuje raspoložive terapijske opcije. Ta činjenica ponešto govori o ukupnoj nedostatnosti razumijevanja tih procesa, koje nam nije u stanju podariti dovoljno učinkovito oružje protiv tog stanja. Imajući to na umu predstoji ostvariti još značajan napredak tumorske biologije. Osobito značajna se u ovom trenutku čini problematika karcinomskih matičnih stanica, odnosno potpuno razumijevanje mehanizama „uspavanosti“ i ranih faza razvoja metastaza – konceptualno odlučujuće u zasijavanju koštanog tkiva tumorskim stanicama, koje od tog trenutka nadalje ostvaruju otpornost na dosadašnje načine liječenja te se nakon razdoblja naizgledne odsutnosti tumorske bolesti pokrenu u razarajućem začaranom krugu.

## 8. Literatura

1. Coleman RE. Metastatic bone disease: clinical features, pathophysiology and treatment strategies. *Cancer Treat Rev.* 2001;27:165-76.
2. Sternberg CN, Baskin-Bey ES, Watson M, Worsfold A, Rider A, Tombal B. Treatment patterns and characteristics of European patients with castration-resistant prostate cancer. *BMC Urol.* 2013;13:58.
3. Gerratana L, Fanotto V, Bonotto M, Bolzonello S, Minisini AM, Fasola G i sur. Pattern of metastasis and outcome in patients with breast cancer. *Clin Exp Metastasis.* 2015;32(2):125-33.
4. Sousa S, Clézardin P. Bone-Targeted Therapies in Cancer-Induced Bone Disease. *Calcif Tissue Int.* 2017 Oct 27. doi: 10.1007/s00223-017-0353-5. [Epub ahead of print]
5. Selvaggi G, Scagliotti GV. Management of bone metastases in cancer: a review. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2005;56(3):365-78.
6. Macedo F, Ladeira K, Pinho F, Saraiva N, Bonito N, Pinto L i sur. Bone Metastases: An Overview. *Oncol Rev.* 2017;11(1):321.
7. Roodman GD. Mechanisms of bone metastasis. *N Engl J Med.* 2004;350(16):1655-64.
8. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(6):453-8.
9. Kang Y, Siegel PM, Shu W, Drobnjak M, Kakonen SM, Córdón-Cardo C i sur. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell.* 2003;3(6):537-49.

10. Buenrostro D, Mulcrone PL, Owens P, Sterling JA. The Bone Microenvironment: a Fertile Soil for Tumor Growth. *Curr Osteoporos Rep.* 2016;14(4):151-8.
11. Kopp HG, Avecilla ST, Hooper AT, Rafii S. The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization. *Physiology (Bethesda).* 2005;20:349-56.
12. Chavez-Macgregor M, Aviles-Salas A, Green D, Fuentes-Alburo A, Gómez-Ruiz C, Aguayo A. Angiogenesis in the bone marrow of patients with breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2005;11(15):5396-400.
13. Vindrieux D, Escobar P, Lazennec G. Emerging roles of chemokines in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2009;16(3):663–673.
14. Yu L, Cecil J, Peng SB, Schrementi J, Kovacevic S, Paul D, et al. Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1. *Gene.* 2006;374:174-179.
15. Sun X, Cheng G, Hao M, Zheng J, Zhou X, Zhang J i sur. CXCL12/CXCR4/CXCR7 chemokine axis and cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* 2010;29(4):709-22.
16. Kan C, Vargas G, Pape FL, Clézardin P. Cancer Cell Colonisation in the Bone Microenvironment. *Int J Mol Sci.* 2016;17(10).
17. Lu DY, Tang CH, Yeh WL, Wong KL, Lin CP, Chen YH, et al. Sdf-1alpha up-regulates interleukin-6 through cxcr4, pi3k/akt, erk, and nf-kappab-dependent pathway in microglia. *Eur J Pharmacol.* 2009;613(1–3):146-154.
18. Levoye A, Balabanian K, Baleux F, Bachelerie F, Lagane B. Cxcr7 heterodimerizes with cxcr4 and regulates cxcl12-mediated g protein signaling. *Blood.* 2009;113(24):6085-6093.

19. Rajagopal S1, Kim J, Ahn S, Craig S, Lam CM, Gerard NP i sur. Beta-arrestin- but not G protein-mediated signaling by the "decoy" receptor CXCR7. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(2):628-32.
20. Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell*. 2007;1(3):313-323.
21. Mazzinghi B, Ronconi E, Lazzeri E, Sagrinati C, Ballerini L, Angelotti ML, et al. Essential but differential role for cxcr4 and cxcr7 in the therapeutic homing of human renal progenitor cells. *J Exp Med*. 2008;205(2):479-490.
22. Sun YX, Schneider A, Jung Y, Wang J, Dai J, Cook K, et al. Skeletal localization and neutralization of the sdf-1(cxcl12)/cxcr4 axis blocks prostate cancer metastasis and growth in osseous sites in vivo. *J Bone Miner Res*. 2005;20(2):318–329.
23. Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*. 2001;410(6824):50-56.
24. Burger M, Glodek A, Hartmann T, Schmitt-Graff A, Silberstein LE, Fujii N, et al. Functional expression of cxcr4 (cd184) on small-cell lung cancer cells mediates migration, integrin activation, and adhesion to stromal cells. *Oncogene*. 2003;22(50):8093-8101.
25. Gao Z, Wang X, Wu K, Zhao Y, Hu G. Pancreatic stellate cells increase the invasion of human pancreatic cancer cells through the stromal cell-derived factor-1/cxcr4 axis. *Pancreatology*. 2010;10(2–3):186–193.

26. Begley L, Monteleon C, Shah RB, Macdonald JW, Macoska JA. Cxcl12 overexpression and secretion by aging fibroblasts enhance human prostate epithelial proliferation in vitro. *Aging Cell*. 2005;4(6):291-298.
27. Matsunaga T, Takemoto N, Sato T, Takimoto R, Tanaka I, Fujimi A, et al. Interaction between leukemic-cell vla-4 and stromal fibronectin is a decisive factor for minimal residual disease of acute myelogenous leukemia. *Nat Med*. 2003;9(9):1158–1165.
28. Ha HK, Lee W, Park HJ, Lee SD, Lee JZ, Chung MK. Clinical significance of CXCL16/CXCR6 expression in patients with prostate cancer. *Mol Med Rep*. 2011;4(3):419-24.
29. Shiozawa Y, Havens AM, Jung Y, Ziegler AM, Pedersen EA, Wang J i sur. Annexin II/annexin II receptor axis regulates adhesion, migration, homing, and growth of prostate cancer. *J Cell Biochem*. 2008;105(2):370-80.
30. Zhao WQ, Chen GH, Chen H, Pascale A, Ravindranath L, Quon MJ, Alkon DL. Secretion of Annexin II via activation of insulin receptor and insulinlike growth factor receptor. *J Biol Chem*. 2003;278:4205–4215.
31. Brownstein C, Falcone DJ, Jacovina A, Hajjar KA. A mediator of cell surface-specific plasmin generation. *Ann NY Acad Sci*. 2001;947:143–156.
32. Diaz VM, Hurtado M, Thomson TM, Reventos J, Paciucci R. Specific interaction of tissue-type plasminogen activator (t-PA) with annexin II on the membrane of pancreatic cancer cells activates plasminogen and promotes invasion in vitro. *Gut*. 2004;53:993–1000.



33. Straub BK, Rickelt S, Zimbelmann R, Grund C, Kuhn C, Iken M i sur. E-N-cadherin heterodimers define novel adherens junctions connecting endoderm-derived cells. *J Cell Biol.* 2011;195(5):873-87.
34. Wang H, Yu C, Gao X, Welte T, Muscarella AM, Tian L i sur. The osteogenic niche promotes early-stage bone colonization of disseminated breast cancer cells. *Cancer Cell.* 2015;27(2):193-210.
35. Curtis C, Shah SP, Chin SF, Turashvili G, Rueda OM, Dunning MJ i sur. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature.* 2012;486(7403):346-52.
36. Guo W, Giancotti FG. Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004;5(10):816-26.
37. Hall CL, Dai JL, van Golen KL, Keller ET, Long MW. Type I collagen receptor ( $\alpha 2\beta 1$ ) signaling promotes the growth of human prostate cancer cells within the bone. *Cancer Res* 2006;66:8648–54.
38. Sung V, Stubbs JT, Fisher L, Aaron AD, Thompson EW. Bone sialoprotein supports breast cancer cell adhesion proliferation and migration through differential usage of the  $\alpha \nu \beta 3$  and  $\alpha \nu \beta 5$  integrins. *J. Cell Physiol.* 1998;176:482-494.
39. Sloan EK, Pouliot N, Stanley KL, Chia J, Moseley JM, Hards DK i sur. Tumor-specific expression of  $\alpha \nu \beta 3$  integrin promotes spontaneous metastasis of breast cancer to bone. *Breast Cancer Res.* 2006;8(2):R20.
40. Zhao Y, Bachelier R, Treilleux I, Pujuguet P, Peyruchaud O, Baron R, et al. Tumor  $\alpha \nu \beta 3$  integrin is a therapeutic target for breast cancer bone metastases. *Cancer Res.* 2007;67:5821-30.

41. Michigami T, Shimizu N, Williams PJ, Niewolna M, Dallas SL, Mundy GR i sur. Cell-cell contact between marrow stromal cells and myeloma cells via VCAM-1 and  $\alpha 4\beta 1$ -integrin enhances production of osteoclast-stimulating activity. *Blood*. 2000;96(5):1953-60.
42. Alford AI, Hankenson KD. Matricellular proteins: Extracellular modulators of bone development, remodeling, and regeneration. *Bone*. 2006; 38(6):749-57.
43. Trotter TN, Yang Y. Matricellular proteins as regulators of cancer metastasis to bone. *Matrix Biol*. 2016;52-54:301-314.
44. Brown DC, Vogel KG. Characteristics of the in vitro interaction of a small proteoglycan (PG II) of bovine tendon with type I collagen. *Matrix*. 1989;9(6):468-78.
45. Xu W, Neill T, Yang Y, Hu Z, Cleveland E, Wu Y i sur. The systemic delivery of an oncolytic adenovirus expressing decorin inhibits bone metastasis in a mouse model of human prostate cancer. *Gene Ther*. 2015;22(3):31-40.
46. Iozzo RV, Buraschi S, Genua M, Xu SQ, Solomides CC, Peiper SC i sur. Decorin antagonizes IGF receptor I (IGF-IR) function by interfering with IGF-IR activity and attenuating downstream signaling. *J Biol Chem*. 2011; 286(40):34712-21.
47. Goldoni S, Humphries A, Nyström A, Sattar S, Owens RT, McQuillan DJ i sur. Decorin is a novel antagonistic ligand of the Met receptor. *J Cell Biol*. 2009; 185(4):743-54.
48. Ishijima M, Rittling SR, Yamashita T, Tsuji K, Kurosawa H, Nifuji A i sur. Enhancement of osteoclastic bone resorption and suppression of osteoblastic bone formation in response to reduced mechanical stress do not occur in the absence of osteopontin. *J Exp Med*. 2001;193(3):399-404.

49. Chen Y, Liu H, Wu W, Li Y, Li J. Osteopontin genetic variants are associated with overall survival in advanced non-small-cell lung cancer patients and bone metastasis. *J Exp Clin Cancer Res.* 2013;32:45.
50. Kang Y, Siegel PM, Shu W, Drobnjak M, Kakonen SM, Cordon-Cardo C i sur. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell.* 2003; 3(6):537-49.
51. Zhang JH, Tang J, Wang J, Ma W, Zheng W, Yoneda T i sur. Over-expression of bone sialoprotein enhances bone metastasis of human breast cancer cells in a mouse model. *Int J Oncol.* 2003; 23(4):1043-8.
52. Elazar V, Adwan H, Bäuerle T, Rohekar K, Golomb G, Berger MR. Sustained delivery and efficacy of polymeric nanoparticles containing osteopontin and bone sialoprotein antisenses in rats with breast cancer bone metastasis. *Int J Cancer.* 2010; 126(7):1749–60.
53. Casimiro S, Luis I, Fernandes A, Pires R, Pinto A, Gouveia AG i sur. Analysis of a bone metastasis gene expression signature in patients with bone metastasis from solid tumors. *Clin Exp Metastasis.* 2012;29(2):155-64.
54. Espinoza I, Liu H, Busby R, Lupu R. CCN1, a candidate target for zoledronic acid treatment in breast cancer. *Mol Cancer Ther.* 2011;10(5):732-41.
55. Zhao C, Irie N, Takada Y, Shimoda K, Miyamoto T, Nishiwaki T i sur. Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis. *Cell Metab.* 2006;4(2):111-21.
56. Roodman GD, Silbermann R. Mechanisms of osteolytic and osteoblastic skeletal lesions. *Bonekey Rep.* 2015;4:753.

57. Zhao Q, Shao J, Chen W, Li YP. Osteoclast differentiation and gene regulation. *Front Biosci.* 2007;12:2519-29.
58. Karaplis AC, Goltzman D. PTH and PTHrP effects on the skeleton. *Rev Endocr Metab Disord* 2000;1:331-41.
59. Ren L, Wang X, Dong Z, Liu J, Zhang S. Bone metastasis from breast cancer involves elevated IL-11 expression and the gp130/STAT3 pathway. *Med Oncol.* 2013;30(3):634.
60. Le Pape F, Vargas G, Clézardin P. The role of osteoclasts in breast cancer bone metastasis. *J Bone Oncol.* 2016;5(3):93-95.
61. Silbermann R, Bolzoni M, Storti P, Guasco D, Bonomini S, Zhou D et al. Bone marrow monocyte-/macrophage-derived activin A mediates the osteoclastogenic effect of IL-3 in multiple myeloma. *Leukemia.* 2014;28:951-954.
62. Choi SJ, Oba Y, Gazitt Y, Alsina M, Cruz J, Anderson J et al. Antisense inhibition of macrophage inflammatory protein 1-alpha blocks bone destruction in a model of myeloma bone disease. *J Clin Invest.* 2001;108:1833–1841.
63. Ohshiba T, Miyaura C, Ito A. Role of prostaglandin E produced by osteoblasts in osteolysis due to bone metastasis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;300(4):957-64.
64. Zhuang X, Zhang H, Li X, Li X, Cong M, Peng F i sur. Differential effects on lung and bone metastasis of breast cancer by Wnt signalling inhibitor DKK1. *Nat Cell Biol.* 2017;19(10):1274-1285.
65. Pinzone JJ, Hall BM, Thudi NK, Vonau M, Qiang YW, Rosol TJ i sur. The role of Dickkopf-1 in bone development, homeostasis, and disease. *Blood.* 2009;113(3):517-25.

66. Taipaleenmäki H, Farina NH, van Wijnen AJ, Stein JL, Hesse E, Stein GS. Antagonizing miR-218-5p attenuates Wnt signaling and reduces metastatic bone disease of triple negative breast cancer cells. *Oncotarget*. 2016;7(48):79032-79046.
67. D'Souza S, del Prete D, Jin S, Sun Q, Huston AJ, Kostov FE i sur. Gfi1 expressed in bone marrow stromal cells is a novel osteoblast suppressor in patients with multiple myeloma bone disease. *Blood* 2011;118: 6871-6880.
68. Chiechi A, Waning DL, Staybrook KR, Buijs JT, Guise TA, Mohammad KS. Role of TGF- $\beta$  in breast cancer bone metastases. *Adv Biosci Biotechnol*. 2013;4(10C):15-30.
69. Xu X, Zheng L, Yuan Q, Zhen G, Crane JL, Zhou X i sur. Transforming growth factor- $\beta$  in stem cells and tissue homeostasis. *Bone Res*. 2018;6:2.
70. Guise TA, Yin JJ, Taylor D, Kumagai Y, Dallas M, Boyce BF i sur. Evidence for a causal role of parathyroid hormone-related protein in the pathogenesis of human breast cancer-mediated osteolysis. *J Clin Invest*. 1996;98(7):1544-9.
71. Sanders JL, Chattopadhyay N, Kifor O i sur. Extracellular calcium-sensing receptor expression and its potential role in regulating parathyroid hormonerelated peptide secretion in human breast cancer cell lines. *Endocrinology*. 2000;141:4357-4364.
72. Shemanko CS, Cong Y, Forsyth A. What Is Breast in the Bone? *Int J Mol Sci*. 2016;17(10).
73. Mehrotra M, Krane SM, Walters K, Pilbeam C. Differential regulation of platelet-derived growth factor stimulated migration and proliferation in osteoblastic cells. *J Cell Biochem*. 2004;93:741-752.
74. Dunstan CR, Boyce R, Boyce BF, Garrett IR, Izbicka E, Burgess WH i sur. Systemic administration of acidic fibroblast growth factor (FGF-1) prevents bone loss and

- increases new bone formation in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res.* 1999;14:953-959.
75. Dai J, Kitagawa Y, Zhang J, Yao Z, Mizokami A, Cheng S i sur. Vascular endothelial growth factor contributes to the prostate cancer-induced osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic protein. *Cancer Res.* 2004;64:994-999.
  76. Rubin J, Chung LW, Fan X, Zhu L, Murphy TC, Nanes MS i sur. Prostate carcinoma cells that have resided in bone have an upregulated IGF-I axis. *Prostate.* 2004;58:41-49.
  77. Hall CL, Bafico A, Dai J, Aaronson SA, Keller ET. Prostate cancer cells promote osteoblastic bone metastases through Wnts. *Cancer Res* 2005; 65:7554-7560.
  78. Clines GA, Mohammad KS, Bao Y, Stephens OW, Suva LJ, Shaughnessy JD Jr i sur. Dickkopf homolog 1 mediates endothelin-1 stimulated new bone formation. *Mol Endocrinol.* 2007;21:486-498.
  79. Schluter KD, Katzer C, Piper HM. A N-terminal PTHrP peptide fragment void of a PTH/PTHrP-receptor binding domain activates cardiac ET(A) receptors. *Br J Pharmacol.* 2001;132:427-432.
  80. Liao J, Li X, Koh AJ, Berry JE, Thudi N, Rosol TJ i sur. Tumor expressed PTHrP facilitates prostate cancer-induced osteoblastic lesions. *Int J Cancer.* 2008;123:2267-2278.
  81. Rabbani SA, Desjardins J, Bell AW, Banville D, Mazar A, Henkin J i sur. An amino-terminal fragment of urokinase isolated from a prostate cancer cell line (PC-3) is mitogenic for osteoblast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;173:1058-1064.

82. Ibrahim T, Flamini E, Mercatali L, Sacanna E, Serra P, Amadori D. Pathogenesis of osteoblastic bone metastases from prostate cancer. *Cancer*. 2010;116(6):1406-18.
83. Killian CS, Corral DA, Kawinski E, Constantine RI. Mitogenic response of osteoblast cells to prostate-specific antigen suggests an activation of latent TGF-beta and a proteolytic modulation of cell adhesion receptors. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993;192:940-947.
84. Iwamura M, Hellman J, Cockett AT, Lilja H, Gershagen S. Alteration of the hormonal bioactivity of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) as a result of limited proteolysis by prostate-specific antigen. *Urology*. 1996;48:317-325.
85. Lu Y, Cai Z, Xiao G, Liu Y, Keller ET, Yao Z *et al*. CCR2 expression correlates with prostate cancer progression. *J Cell Biochem*. 2007;101:676-685.
86. Dasgupta A, Lim AR, Ghajar CM. Circulating and disseminated tumor cells: harbingers or initiators of metastasis? *Mol. Oncol*. 2017;11:40-61.
87. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2014;15:178-196.
88. Campton DE, Ramirez AB, Nordberg JJ, *et al*. High-recovery visual identification and single-cell retrieval of circulating tumor cells for genomic analysis using a dual-technology platform integrated with automated immunofluorescence staining. *BMC Cancer*. 2015;15:360.
89. Banys M, Gruber I, Krawczyk N, Becker S, Kurth R, Wallwiener D *et al*. Hematogenous and lymphatic tumor cell dissemination may be detected in patients diagnosed with ductal carcinoma in situ of the breast. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;131: 801-808.

90. Melchior SW, Corey E, Ellis WJ, Ross AA, Layton TJ, Oswin MM i sur. Early tumor cell dissemination in patients with clinically localized carcinoma of the prostate. Clin Cancer Res. 1997;3: 249-256.
91. Lindemann F, Schlimok G, Dirschedl P, Witte J, Riethmuller G. Prognostic significance of micrometastatic tumour cells in bone marrow of colorectal cancer patients. Lancet. 1992;340:685-689.
92. Roato I, Ferracini R. Cancer Stem Cells, Bone and Tumor Microenvironment: Key Players in Bone Metastases. Cancers (Basel). 2018;10(2).
93. Van der Pluijm G. Epithelial plasticity, cancer stem cells and bone metastasis formation. Bone. 2011;48:37-43.
94. Cao JJ, Singleton PA, Majumdar S, Boudignon B, Burghardt A, Kurimoto P. Hyaluronan increases rankl expression in bone marrow stromal cells through cd44. J. Bone Miner. Res. 2005;20:30-40.
95. Heino, T.J. & Määttä, J.A. Curr Mol Bio Rep (2018). <https://doi.org/10.1007/s40610-018-0091-0>.
96. Goss PE, Chambers AF. Does tumor dormancy offer a therapeutic target? Nat Rev Cancer. 2010;10:871-877.
97. Aguirre-Ghiso JA, Sosa MS. Emerging topics on disseminated cancer cell dormancy and the paradigm of metastasis. Annu. Rev. Cancer Biol. 2018;2:377-93.
98. Aguirre-Ghiso JA. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. Nat Rev Cancer. 2007;7(11):834-46.



99. Sosa MS, Avivar-Valderas A, Bragado P, Wen HC, Aguirre-Ghiso JA. ERK1/2 and p38 $\alpha$ / $\beta$  signaling in tumor cell quiescence: opportunities to control dormant residual disease. *Clin Cancer Res.* 2011;17(18):5850–5857.
100. Sui X, Kong N, Ye L, et al. p38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents. *Cancer Lett.* 2014;344(2):174–179.
101. Chatterjee M, van Golen KL. Farnesyl transferase inhibitor treatment of breast cancer cells leads to altered RhoA and RhoC GTPase activity and induces a dormant phenotype. *Int J Cancer.* 2011;129(1):61–69.
102. Knopeke MT, Ritschdorff ET, Clark R, et al. Building on the foundation of daring hypotheses: using the MKK4 metastasis suppressor to develop models of dormancy and metastatic colonization. *FEBS Lett.* 2011;585(20):3159–3165.
103. Sosa MS, Parikh F, Maia AG, Estrada Y, Bosch A, Bragado P i sur. NR2F1 controls tumour cell dormancy via SOX9- and RAR $\beta$ -driven quiescence programmes. *Nat Commun.* 2015;6:6170.
104. Shiozawa Y, Pedersen EA, Patel LR, Ziegler AM, Havens AM, Jung Y i sur. GAS6/AXL axis regulates prostate cancer invasion, proliferation, and survival in the bone marrow niche. *Neoplasia.* 2010;12(2):116-27.
105. Jung Y, Decker AM, Wang J, Lee E, Kana LA, Yumoto K i sur. Endogenous GAS6 and Mer receptor signaling regulate prostate cancer stem cells in bone marrow. *Oncotarget.* 2016;7(18):25698–25711.
106. Yu-Lee LY, Yu G, Lee YC, Lin SC, Pan J, Pan T i sur. Osteoblast-secreted factors mediate dormancy of metastatic prostate cancer in the bone via activation of the

- TGFβRIII-p38MAPK-pS249/T252RB pathway. *Cancer Res.* 2018 Mar 7. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-1051. [Epub ahead of print]
107. Sosa MS, Avivar-Valderas A, Bragado P, Wen HC, Aguirre-Ghiso JA. ERK1/2 and p38α/β signaling in tumor cell quiescence: opportunities to control dormant residual disease. *Clin Cancer Res.* 2011;17(18):5850–5857.
  108. Ghajar CM., Peinado H., Mori H, Matei IR, Evason KJ, Brazier H i sur. The perivascular niche regulates breast tumour dormancy. *Nature Cell Biology.* 2013;15(7):807-817.
  109. Lu X, Mu E, Wei Y, Riethdorf S, Yang Q, Yuan M i sur. VCAM-1 promotes osteolytic expansion of indolent bone micrometastasis of breast cancer by engaging α4β1-positive osteoclast progenitors. *Cancer Cell.* 2011;20:701-714.
  110. Lu X, Wang Q, Hu G, Van Poznak C, Fleisher M, Reiss M i sur.. ADAMTS1 and MMP1 proteolytically engage EGF-like ligands in an osteolytic signaling cascade for bone metastasis. *Genes Dev.* 2009;23:1882-1894.
  111. Lynch CC, Hikosaka A, Acuff HB, Martin MD, Kawai N, Singh RK i sur. MMP-7 promotes prostate cancer-induced osteolysis via the solubilization of RANKL. *Cancer Cell.* 2005;7:485-496.
  112. Kelly T, Suva LJ, Huang Y, Macleod V, Miao HQ, Walker RC i sur. Expression of heparanase by primary breast tumors promotes bone resorption in the absence of detectable bone metastases. *Cancer Res.* 2005;65:5778-5784.
  113. Cox TR, Rumney RM, Schoof EM, Perryman L, Hoyer AM, Agrawal A i sur. The hypoxic cancer secretome induces pre-metastatic bone lesions through lysyl oxidase. *Nature.* 2015; 522:106-110.

114. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116: 281-297.
115. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: MicroRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology*. 2009;11:228-234.
116. Vidigal JA, Ventura A. The biological functions of miRNAs: Lessons from in vivo studies. *Trends in Cell Biology*. 2015;25:137-147.
117. Chang CH, Fan TC, Yu JC, Liao GS, Lin YC, Shih AC i sur. The prognostic significance of RUNX2 and miR-10a/10b and their inter-relationship in breast cancer. *J Transl Med*. 2014;12(1):257.
118. Croset M, Goehrig D, Frackowiak A, Bonnelye E, Ansieau S, Puisieux A i sur. TWIST1 expression in breast cancer cells facilitates bone metastasis formation. *J Bone Miner Res*. 2014;29(8):1886-99.
119. Taipaleenmäki H, Browne G, Akech J, Zustin J, van Wijnen AJ, Stein JL. Targeting of Runx2 by miR-135 and miR-203 impairs progression of breast cancer and metastatic bone disease. *Cancer Res*. 2015;75(7):1433–44.
120. Baier SR, Wan Y. MicroRNA Exert Macro Effects on Cancer Bone Metastasis. *Curr Osteoporos Rep*. 2016;14(5):163-9.
121. Kuo PL, Liao SH, Hung JY, Huang MS, Hsu YL. MicroRNA-33a functions as a bone metastasis suppressor in lung cancer by targeting parathyroid hormone related protein. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Gen Subj*. 2013;1830(6):3756–66.

122. Gong M, Ma J, Guillemette R, Zhou M, Yang Y, Hock JM i sur. MiR-335 inhibits small cell lung cancer bone metastases via IGF-IR and RANKL pathways. *Mol Cancer Res.* 2014;12(1):101–10.
123. Thery C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: Composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol.* 2002;2:569-579.
124. Zhou W, Fong MY, Min Y, Somlo G, Liu L, Palomares MR i sur. Cancer-secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis. *Cancer Cell.* 2014;25(4):501-515.
125. Fong MY, Zhou W, Liu L, Alontaga AY, Chandra M, Ashby J i sur. Breast-cancer-secreted miR-122 reprograms glucose metabolism in premetastatic niche to promote metastasis. *Nature Cell Biology.* 2015;17(2):183-194.
126. Luo G, He Y, Zhao Q, Yu X. Immune Cells Act as Promising Targets for the Treatment of Bone Metastasis. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 2017;12(3):221-233.
127. Capietto AH, Faccio R. Immune regulation of bone metastasis. *Bonekey Rep.* 2014; 3: 600.
128. Liu Q, Zhang C, Sun A, Zheng Y, Wang L, Cao X. Tumor educated CD11 regulatory dendritic cells suppress T cell response through arginase I. *J Immunol.* 2009; 182(10): 6207-16.
129. Shurin MR, Naiditch H, Zhong H, Shurin GV. Regulatory dendritic cells: New targets for cancer immunotherapy. *Cancer Biol Ther.* 2011; 11(11): 988-92.
130. Wang YC, He F, Feng F, Liu XW, Dong GY, Qin HY, et al. Notch signaling determines the M1 versus M2 polarization of macrophages in antitumor immune responses. *Cancer Res.* 2010; 70(12):4840-9.

131. Chen Q, Zhang XH, Massague J. Macrophage binding to receptor VCAM-1 transmits survival signals in breast cancer cells that invade the lungs. *Cancer Cell*. 2011; 20(4): 538-49.
132. Mizutani K, Sud S, McGregor NA, Martinovski G, Rice BT, Craig MJ, et al. The chemokine CCL2 increases prostate tumor growth and bone metastasis through macrophage and osteoclast recruitment. *Neoplasia*. 2009; 11(11): 1235-42.
133. Zhuang J, Zhang J, Lwin ST, Edwards JR, Edwards CM, Mundy GR, et al. Osteoclasts in multiple myeloma are derived from Gr-1+CD11b+myeloid-derived suppressor cells. *Plos One*. 2012;7(11): e48871.
134. Marigo I, Bosio E, Solito S, Mesa C, Fernandez A, Dolcetti L i sur. Tumor-induced tolerance and immune suppression depend on the C/EBPbeta transcription factor. *Immunity*. 2010; 32(6): 790-802.
135. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2009; 9(3):162-74.
136. Bolin C, Tawara K, Sutherland C, Redshaw J, Aranda P, Moselhy J i sur. Oncostatin m promotes mammary tumor metastasis to bone and osteolytic bone degradation. *Genes Cancer*. 2012; 3(2): 117-30.
137. Olkhanud PB, Baatar D, Bodogai M, Hakim F, Gress R, Anderson RL i sur. Breast cancer lung metastasis requires expression of chemokine receptor CCR4 and regulatory T cells. *Cancer Res*. 2009; 69(14): 5996-6004.
138. Dhodapkar KM, Barbuto S, Matthews P, Kukreja A, Mazumder A, Vesole D i sur. Dendritic cells mediate the induction of polyfunctional human IL17-producing cells

- (Th17-1 cells) enriched in the bone marrow of patients with myeloma. *Blood*. 2008;112:2878–2885.
139. Zhang Q, Liu S, Ge D, Zhang Q, Xue Y, Xiong Z i sur. Interleukin-17 promotes formation and growth of prostate adenocarcinoma in mouse models. *Cancer Res*. 2012;72:2589-2599.
  140. Okamoto T, Yoneyama MS, Hatakeyama S, Mori K, Yamamoto H, Koie T i sur. Core2 O-glycan-expressing prostate cancer cells are resistant to NK cell immunity. *Mol Med Rep* 2013;7(2): 359-64.
  141. Cecchini M, Wetterwald A, Pluijm G, Thalmann G. Molecular and biological mechanisms of bone metastasis. *EAU Update Series* 2005;3:214-26.
  142. Rogers MJ, Crockett JC, Coxon FP, Monkkonen J. Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Bone*. 2011;49:34-41.
  143. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Adjuvant bisphosphonate treatment in early breast cancer: meta-analyses of individual patient data from randomised trials. *Lancet*. 2015;386:1353-1361.
  144. Clezardin P. Frequent low-dose bisphosphonate therapy. *Bone*. 2007;41:901-902.
  145. Ominsky MS, Stouch B, Schroeder J, Pyrah I, Stolina M, Smith SY i sur. Denosumab, a fully human RANKL antibody, reduced bone turnover markers and increased trabecular and cortical bone mass, density, and strength in ovariectomized cynomolgus monkeys. *Bone*. 2011;49:162-173.
  146. Lipton A, Fizazi K, Stopeck AT, Henry DH, Smith MR, Shore N i sur. Effect of denosumab versus zoledronic acid in preventing skeletal-related events in patients with bone metastases by baseline characteristics. *Eur J Cancer*. 2016;53:75-83.

147. Sigl V, Owusu-Boaitey K, Joshi PA, Kavirayani A, Wirnsberger G, Novatchkova M i sur. RANKL/RANK control Brca1 mutation-driven mammary tumors. *Cell Res.* 2016;26:761-774.
148. Mogi M, Kondo A. Down-regulation of mTOR leads to up-regulation of osteoprotegerin in bone marrow cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;384:82-86.
149. Lee KW, Yook JY, Son MY, Kim MJ, Koo DB, Han YM i sur. Rapamycin promotes the osteoblastic differentiation of human embryonic stem cells by blocking the mTOR pathway and stimulating the BMP/Smad pathway. *Stem Cells Dev.* 2010;19:557-568.
150. Sousa S, Clézardin P. Bone-Targeted Therapies in Cancer-Induced Bone Disease. *Calcif Tissue Int.* 2018;102(2):227-250.
151. Turner PG, O'Sullivan JM. (223)Ra and other bone-targeting radiopharmaceuticals-the translation of radiation biology into clinical practice. *Br J Radiol.* 2015;88(1050):20140752.
152. Le Gall C, Bellahcene A, Bonnelye E, Gasser JA, Castronovo V, Green J i sur. A cathepsin K inhibitor reduces breast cancer-induced osteolysis and skeletal tumor burden. *Cancer Res.* 2007;67:9894-9902.
153. Roskoski R Jr. Src protein-tyrosine kinase structure, mechanism, and small molecule inhibitors. *Pharmacol Res.* 2015;94:9-25.
154. Taylor S, Ominsky MS, Hu R, Pacheco E, He YD, Brown DL i sur. Time-dependent cellular and transcriptional changes in the osteoblast lineage associated with sclerostin antibody treatment in ovariectomized rats. *Bone.* 2016;84:148-159.

155. Florio M, Gunasekaran K, Stolina M, Li X, Liu L, Tipton B i sur. A bispecific antibody targeting sclerostin and DKK-1 promotes bone mass accrual and fracture repair. *Nat Commun.* 2016;7:11505.
156. Watanabe K, Hirata M, Tominari T, Matsumoto C, Fujita H, Yonekura K i sur. The MET/vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-targeted tyrosine kinase inhibitor also attenuates FMS-dependent osteoclast differentiation and bone destruction induced by prostate cancer. *J Biol Chem.* 2016;291:20891-20899.



## 9. Životopis

Rođen sam 7.2.1994. Osnovnu školu pohađao sam u Brinju od 2000. do 2008. Zatim sam 2012. završio V. gimnaziju u Zagrebu, i iste godine upisao Medicinski fakultet u Zagrebu. Za vrijeme studija bio sam uključen u rad Katedre za anatomiju i Katedre za patofiziologiju u svojstvu demonstratora. Godine 2017. dobio sam Dekanovu nagradu za uspjeh u akademskoj godini 2017./2018.

## **10. Zahvale**

Hvala mentoru doc.dr.sc. Borislavu Belevu na susretljivom i stručnom vodstvu.

Hvala mojoj obitelji koja me podržava u svakom smislu kroz sve moje životne izazove i prepreke.